

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler

**EpCAM-Expression in Nierentumoren:
Prognostische und diagnostische
Bedeutung**

- eine retrospektive Studie von 948 Fällen -

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Stefan Rehn

geboren am 21.10.1981

aus Rostock

Rostock 2015

Dekan:

Prof. Dr. med. E. Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Institut für Pathologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg
Urologische Universitätsklinik, Universität Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. med. Christian Eichelberg
Urologische Universitätsklinik, Universität Regensburg

Datum der Einreichung: 25.März 2015

Datum der Verteidigung: 02.Dezember 2015

Einmaligkeits- und Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe.

Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Weder mit dieser Dissertation noch mit anderen Arbeiten habe ich Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades an anderen wissenschaftlichen Einrichtungen beantragt.

Stefan Rehn (Rostock, 09.03.2015)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. Erbersdobler, Direktor des Institutes für Pathologie der Universität Rostock und Frau Dr. med. A. Zimpfer, Fachärztin am Institut für Pathologie der Universität Rostock, für die Bereitstellung des Themas, die Anleitung und Betreuung beim Stanzen der Gewebeproben, Auswerten der Tissue-Micro-Arrays, Verarbeitung der gewonnenen Daten sowie der Unterstützung beim Verfassen der Dissertation.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität Rostock gilt mein Dank für die Hilfe beim Anfertigen der Gewebearrays sowie den immunhistochemischen Färbungen.

Frau Anke Litzenberger danke ich für das Heraussuchen der klinischen Verläufe aus dem Krebsregister Rostock.

Für die Beratung hinsichtlich der statistischen Analysen danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Biostatistik und Informatik der Universität Rostock.

Großer Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meiner Lebensgefährtin Anne Dünow, die mir immer mit Rat und Tat sowie moralischer Unterstützung zur Seite stand, und den beiden kleinen Engeln Emil und Tamara, die zwischendurch immer wieder für die notwendige Ablenkung sorgten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mutter, zum Einen für die vielen Stunden des Korrekturlesens, zum Anderen aber auch für die Unterstützung während der Studienzeit sowie in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	EpCAM	11
1.1.1	Das EpCAM-Gen	12
1.1.2	Das EpCAM-Molekül	12
1.1.3	Funktion von EpCAM	14
1.1.4	EpCAM-Expression in gesunden Geweben	14
1.1.5	EpCAM-Expression in malignen Neoplasien	15
1.2	Krebserkrankungen	17
1.2.1	Demographie und Epidemiologie von bösartigen Krebserkrankungen	17
1.3	Tumoren der Niere	18
1.3.1	Nierenkrebserkrankungen in Deutschland	18
1.3.2	Klassifikation der Nierentumoren	18
1.3.3	Nierenzellkarzinome	18
1.3.4	Onkozytome	25
1.3.5	Das Fuhrman-Grading	26
1.4	Zielstellung der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Patienten- und Tumorkollektiv	29
2.2	Die Tissue-Micro-Array-Technik	31
2.3	Herstellung der Tissue-Micro-Arrays der Rostocker Fälle	31
2.4	Anfertigung der Schnittpräparate	36
2.5	EpCAM-Immunhistochemie	36
2.5.1	Definition EpCAM-Expression	37
2.6	Klinische Verläufe	38
2.7	Statistische Analysen	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Morphologische Auswertung	40
3.1.1	EpCAM-Expression der unterschiedlichen Entitäten	40

3.1.2	Expressionsstärken der einzelnen Entitäten	42
3.1.3	EpCAM-Expression in Bezug zum Differenzierungsgrad	43
3.1.4	EpCAM-Expression in Bezug zur regionalen Ausdehnung des Primärtumors	44
3.1.5	EpCAM-Expression in Bezug zum Nodalstatus sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen	45
3.2	Überlebensanalyse	46
3.2.1	Überlebenszeit, unabhängig von der EpCAM-Expression	46
3.2.2	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression	47
3.2.3	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression und dem Differenzierungsgrad der Nierenzellkarzinome	49
3.2.4	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit klinischer Parameter	50
4	Diskussion	51
4.1	Funktion von EpCAM	52
4.2	EpCAM-Expression der Nieren	53
4.3	EpCAM-Expression in Nierentumoren	55
4.4	Überlebenszeitanalysen	58
4.5	Diagnostische Relevanz von EpCAM	61
4.6	Das Antigen EpCAM als Ziel immuntherapeutischer Interventionen	62
5	Zusammenfassung	66
6	Thesen zur Dissertation	68

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das GA733-2-Gen [40].	12
1.2	Die Struktur des EpCAM-Proteins [46].	13
1.3	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [2].	17
1.4	Makroskopischer Aspekt eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms	21
1.5	Histologischer Aspekt eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms	21
1.6	Histologischer Aspekt eines papillären Nierenzellkarzinoms Typ II	22
1.7	Histologischer Aspekt eines chromophoben Nierenzellkarzinoms	23
1.8	Histologischer Aspekt eines Onkozytoms	26
2.1	Großflächenschnitt eines Nierenzellkarzinoms (links), mit Markierung eines geeigneten Tumorareals (Mitte) sowie der dazugehörige Paraffinblock (rechts)	32
2.2	Manual-Tissue-Arrayer	33
2.3	Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA	34
2.4	Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA	34
2.5	Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA	34
2.6	Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA	34
2.7	Schema der Nieren-TMA Rostock und Berlin	35
2.8	Fertiger Array mit 41 gestanzten Tumoren	35
2.9	HE-gefärbtes Schnittpräparat eines TMA mit 41 gestanzten Tumoren	35
2.10	Stanzen (EpCAM) mit Geweben zweier klarzelliger Nierenzellkarzinome	38
3.1	Stanze (HE) mit Gewebe eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms	41
3.2	Stanze (EpCAM) mit Gewebe eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms	41
3.3	EpCAM-Expression aller Nierentumorentitäten in Bezug zum Differenzierungsgrad (nach Fuhrman)	44
3.4	EpCAM-Expression aller Nierentumorentitäten in Bezug zur Ausdehnung des Tumors bei Diagnosestellung	45
3.5	Signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben von Patienten mit EpCAM-exprimierenden chromophoben NZK	49

3.6	Progressionsfreies Überleben von Patienten mit EpCAM-überexprimierenden high-grade NZK	50
4.1	Stanze (HE) mit tumorfreiem Normalgewebe aus der Niere	54
4.2	Stanze (EpCAM) mit tumorfreiem Normalgewebe aus der Niere	54
4.3	Schematische Darstellung des trispezifischen Antikörpers Catumaxumab. . . .	64

Tabellenverzeichnis

1.1	EpCAM-Expression maligner epithelialer Tumoren [mod. nach [10]]	16
1.2	Das Kerngrading nach Fuhrman [27]	27
2.1	Tumorkollektiv	30
2.2	Färbescore EpCAM-Immunhistochemie	37
2.3	Färbescore EpCAM-Immunhistochemie	37
3.1	EpCAM-Expression der unterschiedlichen Nierentumoren	42
3.2	EpCAM-Expressionsstärke der unterschiedlichen Nierentumoren	43
3.3	Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberlebenszeit aller Patienten	46
3.4	Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit sowie des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit EpCAM-Expression und -Überexpression.	47
3.5	Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei EpCAM-Expression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.	48
3.6	Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei EpCAM-Überexpression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.	48
3.7	Kaplan-Meier Analyse des progressionsfreien Überlebens bei EpCAM-Expression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.	48
3.8	Kaplan-Meier Analyse des progressionsfreien Überlebens bei EpCAM-Überexpression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.	49
4.1	EpCAM-Expression klarzelliger Nierenzellkarzinome - ein Literaturvergleich .	55
4.2	Überlebenszeitanalysen EpCAM-exprimierender NZK - ein Literaturvergleich.	60
4.3	Fortsetzung Tabelle 4.2	61

Abkürzungsverzeichnis

EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
kDa	Kilodalton
EGF	Epidermal growth factor
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
LDL	Low density lipoprotein
OIN	Orale intraepitheliale Neoplasie
CIN	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
NZK	Nierenzellkarzinom
WHO	World Health Organisation
TMA	Tissue-Micro-Array
HE	Hämatoxylin-Eosin
CEA	Carcinoembryonales Antigen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
m-TOR	Mammalian target of rapamycin

1. Einleitung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 15.000 Menschen an einem bösartigen Nierentumor. Etwa 5.000 Menschen versterben jährlich an den Folgen dieser Krebserkrankung. Damit gehören die Nieren sowohl beim Mann als auch bei der Frau zu den 10 häufigsten Lokalisationen bösartiger Neubildungen.

Demzufolge stehen Tumoren der Niere und ihre unterschiedlichen Antigenexpressionen sowie deren Bedeutung für Therapieverfahren und prognostische Aussagen für den Patienten schon seit vielen Jahren im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Neue Erkenntnisse über diese Gruppe von Tumoren, Antigene welche an den komplexen Vorgängen der Krebsentstehung beteiligt sind sowie daraus abgeleitete Therapiekonzepte sind ständig Gegenstand neuer Publikationen.

Ein Antigen, welches in den letzten Jahren im Bereich der Nierentumordiagnostik und -prognostik eine immer größere Bedeutung gewonnen hat, ist das 17-1A Antigen (EpCAM), welches nicht nur eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Aggressivität und Metastasierungsneigung von Nierentumoren hat, sondern auch therapeutische Konsequenzen, da es als Tumormarker und Zielantigen bei Immuntherapien verwendet werden kann. Mehrere Antikörper gegen dieses Glycoprotein wurden bis heute entwickelt, einige davon sind bereits zugelassen und werden in klinischen Therapieverfahren eingesetzt.

Unsere Arbeit befasst sich mit der prognostischen Bedeutung der EpCAM-Expression in Tumoren der Niere. Dabei haben wir retrospektiv 948 Fälle von Nierentumoren untersucht, die in den Jahren 1998 - 2012 im Institut für Pathologie der Universität Rostock sowie in den Jahren 1992 - 2004 im Institut für Pathologie der Charite Berlin untersucht wurden.

Unter Verwendung der Tissue-Micro-Array (TMA)-Technik haben wir die Expression von EpCAM in diesen Tumoren immunhistochemisch dargestellt und mit den klinischen follow-up-Daten der Patienten verglichen.

1.1 EpCAM

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) ist ein membranständiges 40 Kilodalton (kDa) schweres, durch das GA733-2 Gen auf Chromosom 4q kodiertes Glycoprotein [40], welches calciumunabhängig homophile interzelluläre Bindungen vermittelt.

1.1.1 Das EpCAM-Gen

Das EpCAM-Molekül wird vom GA 733-2 Gen kodiert. Dieses Gen besteht aus 9 Exons und liegt in der chromosomalen Region 4q [40] (Abbildung 1.1).

Exon 1 kodiert für eine Aminosäure-Sequenz, welche eine für das Einschleusen von EpCAM in die Membran des endoplasmatischen Retikulums notwendige Peptid-Sequenz enthält. Die Exons 2-6 kodieren für die extrazelluläre Domäne von EpCAM, die transmembranöse Domäne wird von Exon 7 kodiert und die zytoplasmatische Domäne von Exon 8 und 9. Exon 9 kodiert weiterhin für das Stopp-Codon und die 3'-untranslatierte Region [10] [47].

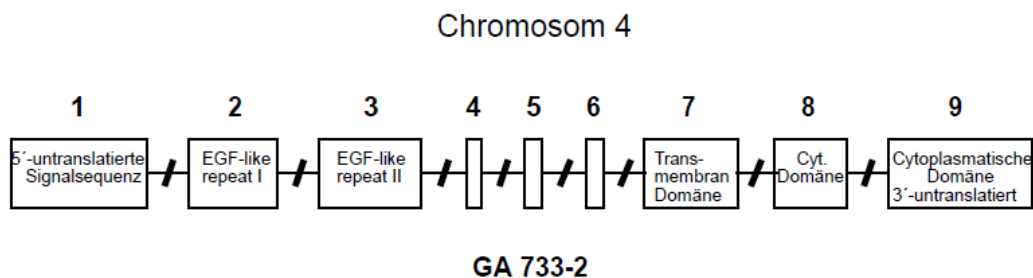


Abbildung 1.1: Das GA733-2-Gen [40].

1.1.2 Das EpCAM-Molekül

Das EpCAM-Molekül ist ein aus 314 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, aufgebaut aus einer 23 Aminosäuren langen Leadersequenz, einem aus 242 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Anteil, einer 23 Aminosäuren langen Transmembrandomäne sowie einem 26 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Anteil [10] (Abbildung 1.2).

Pulse-Chase Experimente zeigen, dass EpCAM als 34 kDa schweres Protein synthetisiert wird und anschließend durch Glykosylierungen mit Mannose-Oligosacchariden zu drei, 38 kDa, 40 kDa und 42 kDa schweren EpCAM-Formen umgewandelt wird. Desweiteren gibt es zwei weitere posttranslational modifizierte Varianten. Diese fünf unterschiedlichen Formen werden allesamt von unterschiedlichen Geweben und/oder Karzinomen exprimiert, unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Glykosylierungsformen sowie eventuell unterschiedliche Gewebeaffinitäten der einzelnen Formen sind bis heute noch nicht beschrieben [41] [10].

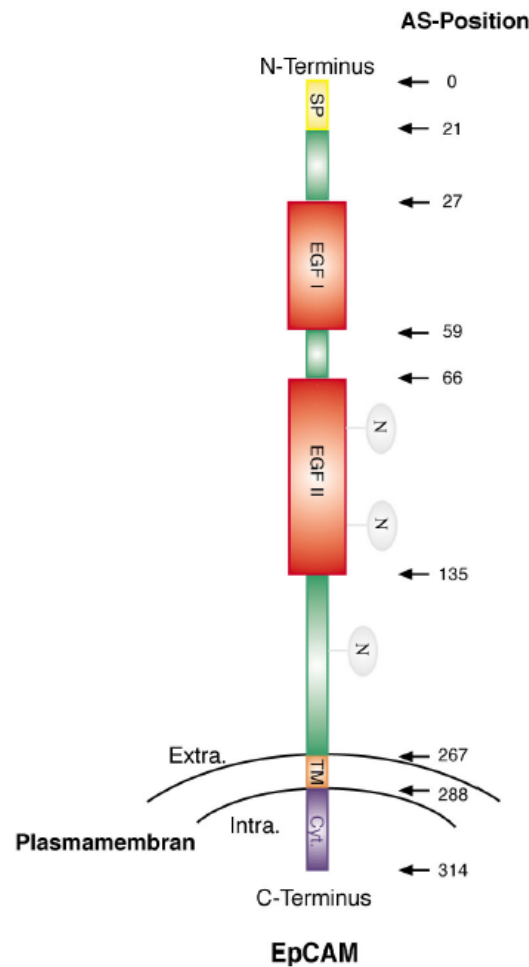


Abbildung 1.2: Die Struktur des EpCAM-Proteins [46].

Die extrazelluläre Domäne

Die extrazelluläre Domäne beginnt am N-Terminus mit einer aus 11 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Signalsequenz. Darauf folgt, wie Sequenzanalysen zeigen, ein Cystein-reicher Anteil, dem sich die Cystein-arme Region der extrazellulären Domäne anschließt. [10].

Der Cystein-reiche N-Terminus besteht aus zwei sich wiederholenden EGF-ähnlichen (EGF-like) Sequenzen, EGF-I auf den Positionen 27-59 und EGF-II auf den Positionen 66-135 [10].

Mehrere Studien an Mäusen zeigen, dass die extrazelluläre Domäne des EpCAM-Moleküls eine der immundominantesten Regionen der Zelloberfläche ist. Dieses Wissen hatte zur Folge, dass eine große Anzahl Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene entwickelt wurden, welche spezifisch mit der extrazellulären Domäne des EpCAM-Moleküls reagieren.

So reagieren z.B. die Antikörper 17-1A, KS1/4, GA733, 323/A3, MOC31 mit der ersten

EGF-ähnlichen Sequenz, der Antikörper 2G8 mit der zweiten Sequenz und die Antikörper 311-1K1 und MM104 mit der Cystein-armen Region [10].

Diverse weitere, die Zelladhäsion und Signaltransduktion beeinflussende Transmembranproteine, wie beispielsweise Integrine und Zelladhäsionsmoleküle, weisen, wie EpCAM, großteils homologe EGF-ähnliche Wiederholungen auf [21].

Die transmembranöse und die intrazelluläre Domäne

Die Transmembrandomäne des EpCAM-Moleküls besteht aus 23 Aminosäuren. Der folgende intrazelluläre Anteil besteht aus 26 Aminosäuren und enthält ein Internalisierungsmotiv (NPXY), welches schon in mehreren oberflächlichen Zellrezeptoren, wie z.B. dem LDL-Rezeptor oder dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor beschrieben wurde [34].

1.1.3 Funktion von EpCAM

EpCAM ist ein epithelspezifisches Zelladhäsionsmolekül, welches calciumunabhängig homophile interzelluläre Bindungen vermittelt sowie über Induktion des Protoonkogen c-myc regulierend in den Zellzyklus eingreifen kann [10] [47] (siehe Diskussionsteil).

1.1.4 EpCAM-Expression in gesunden Geweben

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass EpCAM ein beim Menschen ausschließlich epitheliales Molekül ist, welches an der basolateralen Membran der Epithelzellen exprimiert wird. Vor allem in Drüsenepithelien, aber auch in Urothelzellen wird EpCAM exprimiert.

Gesundes Plattenepithel hingegen exprimiert kein EpCAM [10] [45] [47].

Neoplasien dieser Gewebe gehen stets mit einer gesteigerten Expression von EpCAM einher. Plattenepithelkarzinome zeigen eine de novo Expression, wobei die EpCAM-Proteinmenge mit dem Grad der Dysplasie korreliert [10] [41].

Sowohl Gewebe mesenchymaler oder neuroendokriner Herkunft, als auch lymphatisches Gewebe zeigen keine EpCAM-Expression [10] [47].

Die Expressionsstärke kann zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen deutlich variieren, so zeigt z.B. im Gastrointestinaltrakt das Drüsenepithel des Magens nur schwache EpCAM-Konzentrationen, das Drüsenepithel des Dünndarms deutlich höhere Expressionen und das Dickdarmepithel die höchsten EpCAM-Konzentrationen aller epithelialer Zellen. In den unteren Atemwegen zeigt sich eine EpCAM-Positivität der Trachea, der Bronchien und der Alveolen. Das Drüsenepithel der Gallenblase sowie die intrahepatischen Gallengänge sind EpCAM-positiv, adulte Hepatozyten zeigen dagegen keine Expression. Im Pankreas wird EpCAM sowohl in Gangepithelien als auch in den Azini und in geringerer Ausprägung auch in den endokrinen Drüsen der Langerhans'schen Inseln exprimiert. In der Haut zeigen die Schweißdrüsen und Haarfollikel eine geringe Positivität, während die Keratinozyten nega-

tiv sind. Die neuroendokrin differenzierten Zellen der Haut sowie das dermale Bindegewebe zeigen keine EpCAM-Expression. Die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Hypophyse und Nebenniere) enthalten EpCAM-positive Epithelien. In den Brustdrüsen wurden in den Gangepithelien relativ hohe EpCAM-Level detektiert, im Gegensatz zu den Drüsenzellen der alveolären Endstücke. Desweiteren exprimieren auch die Organe des weiblichen Genitaltraktes (Ovar, Eileiter, Uterus, Cervix) das EpCAM-Molekül. In den Geweben des männlichen Genitaltraktes zeigen die Prostata und die Samenblasen relativ hohe Expressionsmuster, während nur wenige epitheliale Zellen des Hodens positiv waren [45] [10]. Die Nieren weisen in den Glomeruli sowie den unterschiedlichen Abschnitten des Tubulusapparates unterschiedliche Expressionsmuster von EpCAM auf (siehe Diskussionsteil).

In Phasen der Proliferation und Regeneration zeigen viele Gewebe gesteigerte EpCAM-Werte.[33].

1.1.5 EpCAM-Expression in malignen Neoplasien

Entsprechend dem Verteilungsmuster in nicht entarteten epithelialen Strukturen exprimieren fast alle Karzinome EpCAM, wobei die maligne Entartung, wie bereits erwähnt, meist mit einer verstärkten oder de-novo-Expression von EpCAM assoziiert ist [33] [41]. So zeigen sich beispielsweise in Adenokarzinomen des Magens sehr hohe EpCAM-Konzentrationen obwohl das normale Drüsenepithel des Magens nur geringe Konzentrationen aufweist[10].

Auch zeigt sich ein stetiger Anstieg der EpCAM-Expression in Vorstufen maligner epithelialer Tumoren. So wurden beispielsweise in gering- und mäßiggradigen oralen intraepithelialen Neoplasien (OIN I + II) hohe EpCAM-Konzentrationen in den basalen und suprabasalen Zellen des Epithels festgestellt mit einer deutlichen Grenze zu den nicht dysplastischen, EpCAM-negativen oberflächlichen Epithelzellen. Intraorale Neoplasien Grad III weisen hingegen bis zu 100% EpCAM-positive Zellen in allen Schichten des Plattenepithels auf [33]. Ähnlich verhält es sich bei den Vorstufen des Cervixkarzinoms, die Expressionsstärke von EpCAM nimmt von CIN I zu CIN III kontinuierlich zu [10] [47].

Anders verhält es sich bei Hepatozyten, die während der Embryonalentwicklung EpCAM-positiv sind, in der adulten Leber allerdings negativ. Auch bei der malignen Entartung kommt es zu keiner Expression von EpCAM, sodass das hepatozelluläre Karzinom negativ bleibt [22] (Tabelle 1.1).

Nichtepitheliale Tumoren sind EpCAM-negativ [10].

Die Höhe der EpCAM-Expression korreliert mit der proliferativen Aktivität und verhält sich reziprok zum Differenzierungsgrad. Dieses zeigte sich z.B. bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, bei denen gut differenzierte Tumoren negativ für EpCAM waren, gering differenzierte Tumoren allerdings eine teilweise deutliche Positivität aufwiesen [33].

Auch die meisten Tumoren der Nieren exprimieren EpCAM, je nach Subtyp in unterschiedlicher Häufigkeit und Intensität (siehe Diskussionsteil).

Tabelle 1.1: EpCAM-Expression maligner epithelialer Tumoren [mod. nach [10]]

Tumor	EpCAM-Expression
Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	+
Plattenepithelkarzinom des Larynx	+
Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	+
Adenokarzinom des Magens	++
Adenokarzinom des Dünndarms	+++
Kolorektale Karzinome	+++
Adenokarzinom des Pankreas	++
Adenokarzinom der Lunge	+++
Cholangiozelluläres Karzinom	++
Basalzellkarzinom der Haut	++
Nierenzellkarzinome	++
Urothelkarzinome	++
Schilddrüsenkarzinome	++
Prostatakarzinome	++
Ovarialkarzinome	++
Endometriumkarzinome	+++
Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri	++
Adenokarzinome der Cervix uteri	+++
Mammakarzinome	++
Hepatozelluläres Karzinom	-
Plattenepithelkarzinom der Haut	-

Tabelle 1.1 zeigt die Intensität der EpCAM-Expression unterschiedlicher Tumoren, die Intensität wird dabei wie folgt codiert: - keine Expression; + geringe Expression; ++ mittelgradige Expression; +++ hohe Expression

1.2 Krebserkrankungen

1.2.1 Demographie und Epidemiologie von bösartigen Krebserkrankungen

Im Jahr 2010 wurden laut statistischem Bundesamt in Deutschland bei insgesamt 477.300 Personen eine Krebserkrankung neu diagnostiziert, 218.258 Personen verstarben in diesem Jahr an einer malignen Erkrankung [2]. Jeder vierte Todesfall war somit auf eine Krebserkrankung zurückzuführen.

Die häufigste Tumorlokalisation bei Männern war die Prostata mit 65.830 Neuerkrankungen (26,1 %), bei Frauen die Brustdrüse mit 70.340 Neuerkrankungen (31,3 %).

Die häufigste Krebserkrankung mit Todesfolge war bei Männern das Bronchialkarzinom mit 29.381 Fällen (24,9 % aller Krebssterbefälle bei Männern). Bei den Frauen war die häufigste Krebstodesursache das Mammakarzinom mit 17.466 Fällen (17,4 % aller Krebssterbefälle bei Frauen).

Tumoren der Niere sind im Vergleich hierzu eher selten, mit 8950 (3,5 %) Neuerkrankungen und 3096 (2,6 %) Todesfällen bei Männern sowie 5570 (2,5%) Neuerkrankungen und 2151 (2,1%) Todesfällen bei Frauen sind sie aber keinesfalls als Raritäten zu betrachten (Abbildung 1.3).

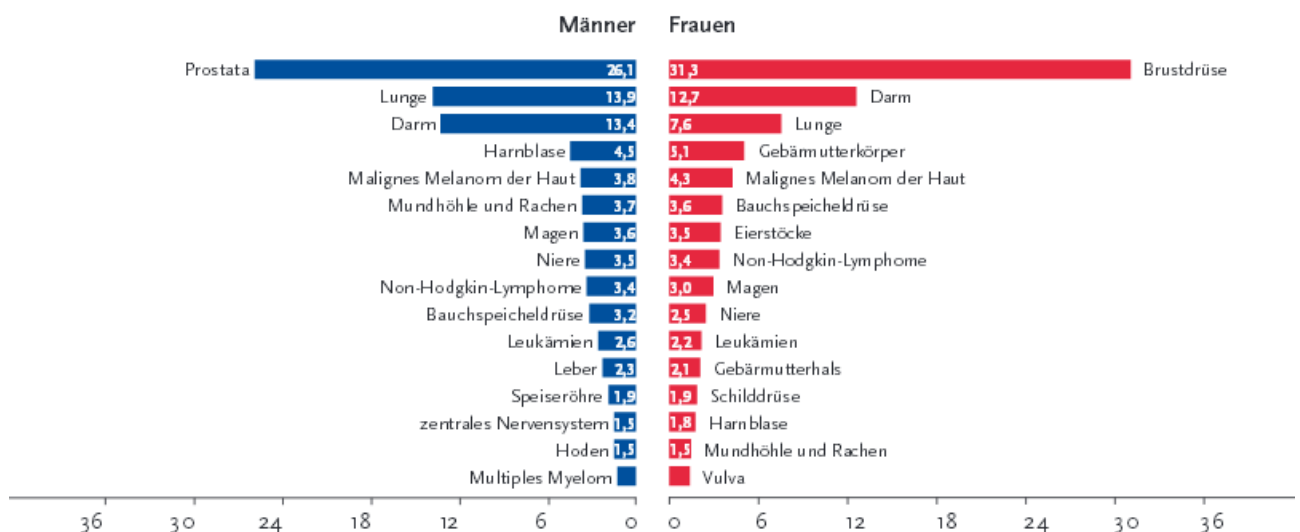


Abbildung 1.3: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [2].

1.3 Tumoren der Niere

Tumoren der Niere machen weltweit etwa 2 % aller Tumoren des Menschen aus und sind zu über 90 % maligne. Etwa 190.000 Neuerkrankungen werden jedes Jahr weltweit neu diagnostiziert [8].

Männer sind nahezu doppelt so häufig betroffen wie Frauen [3]

1.3.1 Nierenkrebserkrankungen in Deutschland

Laut dem statistischen Bundesamt sowie Veröffentlichungen des Robert Koch Institutes wurden im Jahr 2010 wie bereits erwähnt 14.520 Neuerkrankungen an bösartigen Tumoren der Niere, davon 8950 bei Männern und 5570 bei Frauen verzeichnet. In diesem Jahr verstarben an Nierenzellkarzinomen 3096 Männer und 2151 Frauen [6] [3].

1.3.2 Klassifikation der Nierentumoren

Als Nierentumoren werden alle Tumoren zusammengefasst, die in der Niere lokalisiert sind.

Dazu gehören die Tumoren die vom Nierenparenchym ausgehen sowie die Tumoren des Nierenbeckens (Urothelkarzinome des Nierenbeckens). Auch Metastasen anderer Tumoren (z.B. Bronchialkarzinome, maligne Melanome) können sich in der Niere absiedeln.

Die Tumoren, die primär vom Nierenparenchym ausgehen, werden nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eingeteilt in die epithelialen Nierenzelltumoren, zu denen die Nierenzellkarzinome (NZK), die > 90% aller Nierentumoren ausmachen, die papillären Nierenzelladenome sowie die Onkozytome gehören. Desweiteren gehören hierzu noch die metanephrischen Tumoren, die nephroblastischen Tumoren mit dem Nephroblastom des Kindesalters sowie eine Vielzahl an, jeweils äußerst seltenen, mesenchymalen, gemischt mesenchymal und epithelialen, neuroendokrinen und Keimzelltumoren. Auch maligne Lymphome können sich im Bereich der Nieren manifestieren [8].

1.3.3 Nierenzellkarzinome

Nierenzellkarzinome sind maligne epitheliale Tumoren die sich von unterschiedlichen Abschnitten des Nierentubulussystems oder den Sammelrohren ableiten. Man unterscheidet klarzellige, papilläre, chromophobe, unklassifizierbare Nierenzellkarzinome sowie die seltenen Sammelrohrkarzinome.

Desweiteren gibt es diverse seltene Formen des Nierenzellkarzinoms, wie das multilokulärzystische, das medulläre, das muzinös-tubuläre und das Spindelzellkarzinom der Niere.

Nierenzellkarzinome sind hauptsächlich Tumoren des Erwachsenenalters, das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnose beträgt 55-60 Jahre, im Kindesalter sind sie fast ausschließlich in Verbindung mit spezifischen chromosomalen Translokationen zu beobachten [19][14].

Zu den Risikofaktoren zählen Lebensgewohnheiten, Umwelteinflüsse und genetische Faktoren. So gilt Nikotinkonsum als wichtigster Risikofaktor. Ein Zusammenhang von Adipositas und dem Auftreten von Nierenkrebs scheint vor allem bei Frauen zu bestehen. Auch Alkohol erwies sich in Studien als möglicher Risikofaktor. Eine chronische Niereninsuffizienz mit langjähriger Dialysebehandlung begünstigt unabhängig von ihrer Ursache die Krebsentstehung. Auch können berufsbedingte dauerhafte Expositionen gegenüber nierenschädigenden Substanzen, wie zum Beispiel Halogenkohlenwasserstoffen und Cadmium, das Erkrankungsrisiko erhöhen. Die adulte polyzystische Nierendysplasie (Typ III nach Potter) geht ebenfalls mit einem erhöhten Entartungsrisiko einher. Eine familiäre Belastung spielt bei den Nierentumoren eine vergleichsweise geringe Rolle, wenn, dann meist im Zusammenhang mit erblichen Tumorerkrankungssyndromen wie zum Beispiel der von-Hippel-Lindau-Erkrankung [8] [3] [12][20].

Nierenzellkarzinome verursachen üblicherweise erst spät Beschwerden, zu den häufigsten Symptomen zählen dann Hämaturie und Flankenschmerz. Desweiteren können Nierenzellkarzinome, da sie häufig sehr groß werden können, als tastbarer Tumor im Bereich der Flanke auffallen. Nicht selten allerdings werden Tumoren der Niere auch als Zufallsbefund bei radiologischen Untersuchungen anderweitiger Fragestellungen entdeckt.

Im fortgeschrittenen Stadium können dann auch die Allgemeinsymptome von Tumorerkrankungen, wie Gewichtsverlust, Müdigkeit, Anämie und Fieber beobachtet werden.

Gelegentlich fallen Nierenzellkarzinome erst durch die durch Metastasen verursachten Symptome auf. Die häufigsten Lokalisationen von Metastasen sind die Lungen (75%), Knochen (40%), Leber (30%), Nebennieren (20%) und Gehirn (15%).

Weiterhin können systemische und paraneoplastische Syndrome, hervorgerufen durch die durch den Tumor gebildeten Hormone (z.B. Renin, Erythropoetin, ACTH), beobachtet werden. Hier sind unbeherrschbare hypertensive Erkrankungszustände, sekundäre Polycythämien oder sekundäre Cushing-Syndrome zu nennen [4] [19] [8].

In Abhängigkeit von Tumorgroße und -stadium ist die radikale Entfernung der Niere mit umgebender Fettkapsel, Gerotafaszie und gegebenenfalls Nebenniere die Therapie der Wahl des nicht metastasierten Nierenzellkarzinoms. Bei kleineren Tumoren sowie vorbestehender Einnierigkeit steht die nierenerhaltende Tumorentfernung als Therapieoption zur Verfügung. Weder mit Tumorbestrahlungen oder chemotherapeutischen Behandlungen konnten entscheidende Vorteile für die betroffenen Patienten erzielt werden [3].

In der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms galt bis 2006 die radikale Nephrektomie mit anschließender Immuntherapie als Therapie der Wahl. Mit Einführung diverser systemischer Therapeutika als primäre Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms konnten signifikante Verbesserungen des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens erzielt werden.

Hierzu gehören u.a. die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib, sowie der VEGF-Hemmstoff Bevacizumab, die einzeln oder in Kombination mit immunstimulierenden Medikamenten (Interleukin-2; α -Interferone) als first-line-Therapie, speziell beim klarzelligen

NZK eingesetzt werden. Bei Nichtansprechen dieser Therapie, sowie bei Hochrisikopatienten und bei Patienten mit nicht-klarzelligen NZK steht mit Temsirolimus ein Hemmstoff des m-TOR-pathways zur Verfügung. Weitere Studien mit anderen Chemotherapeutika wie beispielsweise 5-Fluoruracil und Gemcitabine zeigten keinen signifikanten therapeutischen Effekt. In Einzelfällen konnte eine Hochdosis-Immuntherapie (Interleukin-2-Bolus) einen kurativen Effekt aufweisen [4] [32] [44] [43] [51].

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms ist im Vergleich zu vielen anderen malignen Tumorerkrankungen recht gut. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren, wie dem Tumorstadium und der Metastasierung bei Diagnosestellung, dem histologischer Tumortyp, dem Differenzierungsgrad des Tumors und patientenspezifischen Faktoren wie Alter und Geschlecht liegt die 5 Jahres-Überlebensrate aller Nierenzellkarzinome bei insgesamt etwa 70% [8].

Das klarzellige Nierenzellkarzinom

Klarzellige Karzinome sind mit über 80% der häufigste Nierenzellkarzinomtyp und werden deshalb von einigen Autoren als konventionelle Nierenzellkarzinome bezeichnet. Sie kommen in beiden Nieren gleich häufig vor, multizentrisches oder bilaterales Wachstum ist mit unter 5% selten und dann meist assoziiert mit dem von-Hippel-Lindau-Syndrom.

Klarzellige Nierenzellkarzinome zeigen sich makroskopisch meist als ein großer, pseudokapsulär gut gegen das angrenzende Nierenparenchym abgrenzbarer, die Nierenoberfläche meist deutlich vorbuckelnder Tumor mit inhomogener weiß-gelblicher Schnittfläche. Nicht selten zeigen die Tumoren regressive Veränderungen wie Einblutungen, Kalzifikationen oder Nekrosen, auch zystische Wuchsmuster kommen vor [7] [8] (Abbildung 1.4). Große Tumoren können in das perirenale Fettgewebe, das Nierenbecken oder die Nierenvene einbrechen. In Einzelfällen entstehen Tumorthromben in der Vena cava, die bis in den rechten Herzvorhof reichen können.

Der histologische Aspekt ist, wie der Name schon sagt, geprägt durch große Tumorzellen mit hellem Zytoplasma. Die Zellgrenzen sind meist äußerst scharf, wodurch sich ein Bild mit pflanzenzellartigem Aspekt („vegetable cells“) ergibt (Abbildung 1.5). Dieser hellzellige Aspekt der Tumorzellen resultiert aus einem hohen Glycogen- und Lipidgehalt [7] [8].

In den meisten Fällen sowohl sporadischer als auch hereditärer klarzelliger Karzinome, nicht aber bei den anderen Subtypen, wurde eine endständige Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 3, beginnend bei 3p13 entdeckt [42]. Das VHL-Gen ist hier lokalisiert (3p25-26), aber auch andere hier lokalisierte Gene (z.B.: FHIT; RASSF1A; DRR1) spielen bei der Entstehung klarzelliger Karzinome eine entscheidende Rolle [8].

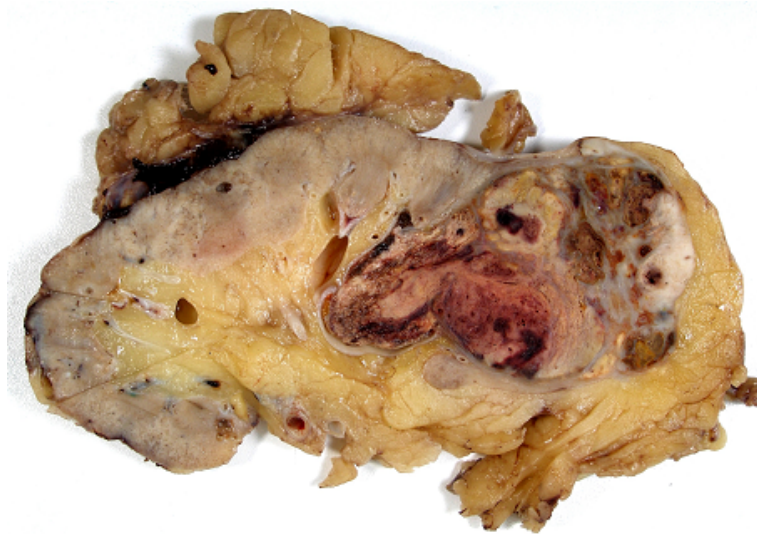


Abbildung 1.4: Makroskopischer Aspekt eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms

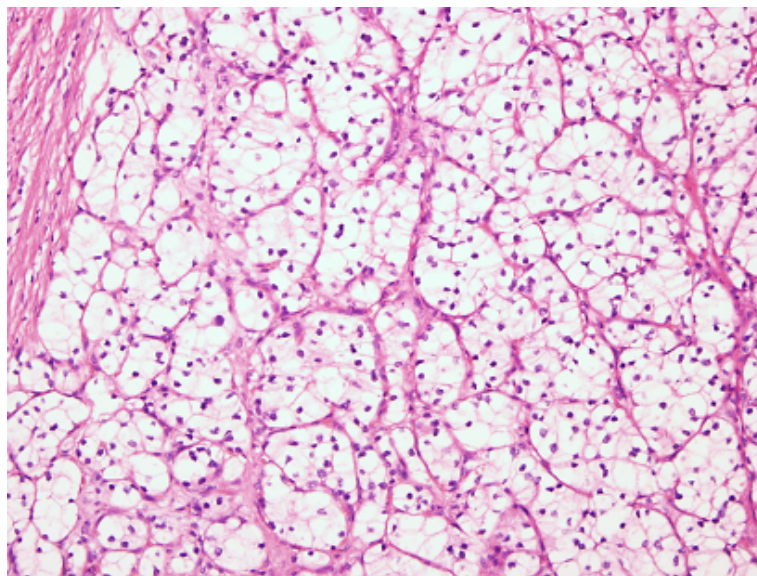


Abbildung 1.5: Histologischer Aspekt eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Das papilläre Nierenzellkarzinom

Papilläre Nierenzellkarzinome liegen in etwa 15 % der Fälle vor. Sie treten meist sporadisch auf, aber auch hereditäre Formen wurden beobachtet, diese sind assoziiert mit einer Keimbahnmutation des c-MET-Onkogens. Bilaterales oder multifokales Wachstum ist beim papillären Nierenzellkarzinom häufiger zu beobachten als bei anderen Nierentumoren [8]. Nierenzellkarzinome bei Hämodialysepatienten sind gehäuft vom papillären Subtyp [35].

Makroskopisch sind papilläre Nierenzellkarzinome meist rundlich und von einer fibrösen Pseudokapsel begrenzt. Auch papilläre Karzinome sitzen meist direkt unter der Capsula fibrosa, große Tumoren können die Nierenoberfläche deutlich vorbuckeln. Nicht selten treten Einblutungen und ausgedehnte Nekrosen auf [7] [8].

Histologisch sind die Tumoren papillär aufgebaut, die Papillen sind ausgekleidet durch ein-oder mehrreihige Tumorzelllagen. Anhand ihrer Zytoplasmafärbung lassen sich diese Tumoren weiter unterteilen in Typ I (basophiler Typ) und Typ II (eosinophiler Typ). Beim basophilen Subtyp sind die Papillen durch eine einzige Lage von Tumorzellen mit spärlichem blassen Zytoplasma ausgekleidet. Ein begleitendes Infiltrat neutrophiler Granulozyten und schaumzellig umgewandelten Makrophagen ist bei diesem Subtyp häufig zu beobachten. Der deutlich seltenere eosinophile Subtyp ist dadurch gekennzeichnet, dass die Papillen durch mehrreihig geschichtete Tumorzellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma ausgekleidet sind [8] [7] (Abbildung 1.6). Der eosinophile Subtyp scheint im Vergleich zum basophilen Subtyp mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einherzugehen. Zusammenfassend haben papilläre Nierenzellkarzinome aber eine bessere Prognose als klarzellige Nierenzellkarzinome, die 5-Jahresüberlebensrate liegt in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und dem Stadium des Tumors bei Erstdiagnose zwischen 49% und 84% [8].

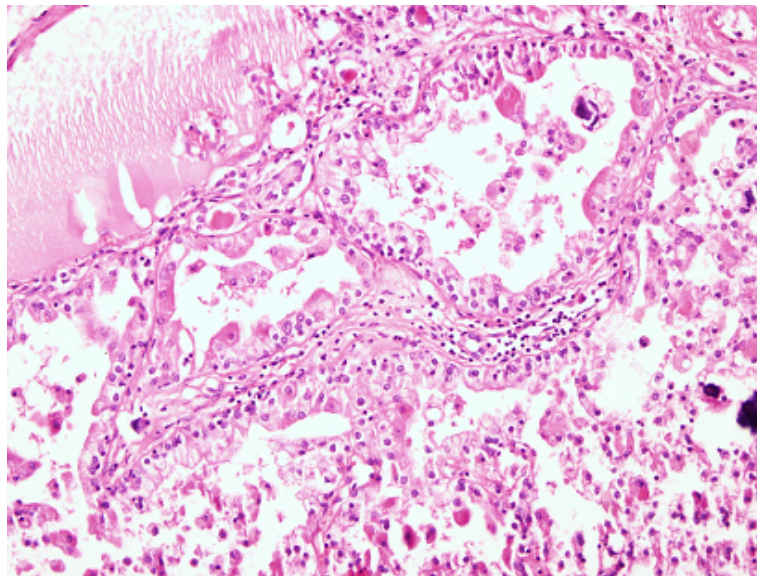


Abbildung 1.6: Histologischer Aspekt eines papillären Nierenzellkarzinoms Typ II

Die wichtigsten chromosomalen Aberrationen beim papillären Nierenzellkarzinom sind Trisomie 7, Trisomie 17 und Verlust des Y-Chromosoms. Auch Trisomien diverser anderer Chromosomen (3q, 8, 12, 16, 20) wurden in wenigen Fällen beobachtet [36] [8].

Das chromophobe Nierenzellkarzinom

Chromophobe Nierenzellkarzinome machen nur etwa 5% aller Nierenzellkarzinome aus, auch hier existieren sowohl sporadische als auch hereditäre Formen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der sechsten Lebensdekade. Im Gegensatz zu den anderen Nierenzellkarzinomen liegt beim chromophoben Karzinom eine ausgeglichene Geschlechterverteilung vor.

Chromophobe Karzinome zeigen sich makroskopisch als gut umschriebene solitäre Knoten mit feinlobulierter homogener Schnittfläche, welche im unfixierten Zustand rot-bräunlich, nach Formalinfixierung dann eher hellgrau imponieren. Blutungen oder Zystenbildungen sind selten, Nekrosen kommen nicht vor [8] [7].

Histologisch wachsen chromophobe Nierenzellkarzinome meist in soliden Formationen, die Tumorzellen sind groß, polygonal mit feinretikulärem eosinophilem Zytoplasma und deutlich akzentuierten Zellgrenzen. Die großen Zellkerne zeigen eine typische perinukleäre Aufhellungszone (Abbildung 1.7). Elektronenmikroskopisch zeigen die Karzinomzellen jeweils mehrere zytoplasmatische Vesikel. Die Vesikel lassen sich mit der Hale-Färbung für kolloidales Eisen anfärben, ihre zytoplasmatische Anfärbbarkeit gilt als pathognomisch für das chromophobe Nierenzellkarzinom [13].

Histologisch weisen chromophobe Karzinome Ähnlichkeiten mit Onkozytomen (s.u.) auf, was nicht selten zu diagnostischen Schwierigkeiten führen kann.

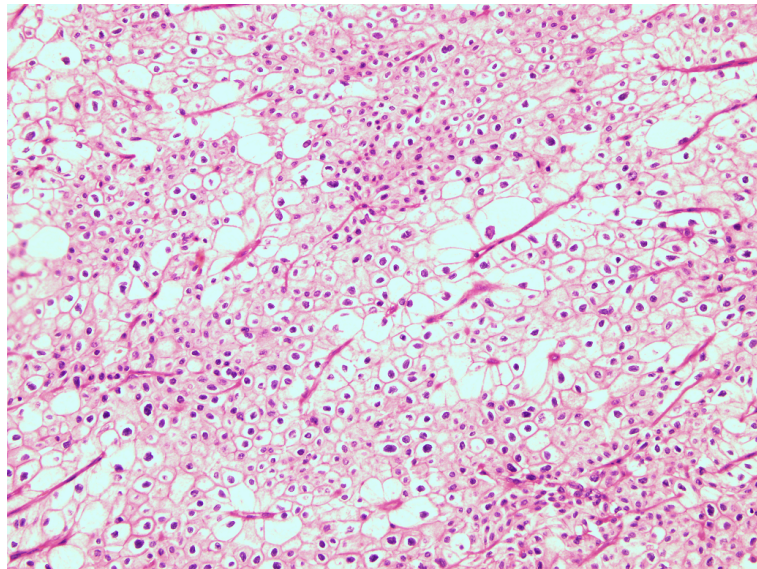


Abbildung 1.7: Histologischer Aspekt eines chromophoben Nierenzellkarzinoms

Mehrere Chromosomenverluste (1,2,6,10,13,17,21) wurden mittels vergleichender Genomhybridisierung detektiert [8] [55] [1].

Chromophobe Nierenzellkarzinome haben die beste Prognose aller Nierenzellkarzinome, die Mortalität liegt deutlich unter 10 % [8]. Die Vielzahl der chromophoben Karzinome (86% [8]) werden in Stadium 1 oder Stadium 2 diagnostiziert und lymphogene oder hämatogene Metastasen sind selten. Dennoch ist die Differentialdiagnose des ähnlich aussehenden gutartigen Onkozytoms von großer Bedeutung, da das chromophobe Karzinom in sarkomatoid-dedifferenzierte Varianten übergehen kann und dann ein deutlich aggressiveres Tumorstadium sowie eine höhere Metastasierungstendenz aufweist [8].

Das Sammelrohrkarzinom - Bellini-Gang Karzinom

Tumoren, die ihren Ursprung im Sammelrohrsystem der Nieren haben sind mit <1% der Nierenzellkarzinome selten. Es handelt sich um sehr aggressiv wachsende Tumoren, die sich vornehmlich in der Markzone aus dysplastischen Epithelien der Sammelrohre entwickeln [8] [7].

Makroskopisch präsentiert sich das Sammelrohrkarzinom als multilobulierter, unscharf begrenzter, meist solitärer, knotiger Tumor von fester Konsistenz mit grau-weißlicher Schnittfläche, der vom Zentrum der Niere nach peripher wächst. Häufig zeigen sich ausgeprägte Tumornekrosen und Einblutungen.

Histologisch kann sich das Sammelrohrkarzinom recht vielgestaltig präsentieren, klassischerweise zeigt es tubulopapilläre Wachstumsmuster mit ausgeprägter Infiltration des Nierenparenchyms durch irregulär aufgebaute Drüsen mit begleitender, stark ausgeprägter desmoplastischer Stromareaktion. Die Tumorzellen haben meist ein breit entwickeltes eosinophiles Zytoplasma und hochgradig pleomorphe Kerne. Sowohl zystische Veränderungen als auch sarkomatoide Dedifferenzierungen können vorkommen [8] [7]. PAS-positive intrazytoplasmatische Schleimbildung, teilweise assoziiert mit einer siegelringzelligen Morphologie, kann in Sammelrohrkarzinomen, im Gegensatz zu den konventionellen Nierenzellkarzinomen beobachtet werden [7].

Genetische Aberrationen sind aufgrund der sehr geringen Fallzahlen beim Sammelrohrkarzinom noch wenig bekannt, diverse Chromosomenverluste (1,6,14,15,22) [28] sowie Deletionen [56] [8] wurden in einigen Fällen beobachtet. Im Gegensatz zu klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurden HER2/neu Amplifikationen beim Sammelrohrkarzinom beschrieben [54] [8].

Die Prognose von Sammelrohrkarzinomen ist äußerst schlecht, die meisten Tumoren wachsen aggressiv und haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits hämatogene Fernmetastasen gesetzt. Etwa zwei Drittel der Patienten versterben innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung [8].

Das sarkomatoide Nierenzellkarzinom

Sarkomatoide Karzinome (spindelzellig-pleomorphe, dedifferenzierte Areale) werden in gegenwärtigen Klassifikationen von Nierenzelltumoren, bei fehlendem Nachweis einer de-novo-Genese, nicht mehr als eigenständiger Subtyp des Nierenzellkarzinoms angesehen, sondern als begleitende Komponente, die bei allen histologischen Varianten des Nierenzellkarzinoms vorkommen kann [8] [7]. Meist kommen sarkomatoide Areale nur fokal begrenzt in den oben genannten Tumorentitäten vor, reine sarkomatoide Karzinome sind sehr selten ($< 1\%$). Aber auch deren Ursprung kann meist mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden und auch diese Tumoren werden als dedifferenzierte Varianten einer der beschriebenen Tumorentitäten zugeordnet. Ist auch mittels immunhistochemischer Färbungen keine Zuordnung zum Ursprungsgewebe mehr zu treffen, werden diese Tumoren als unklassifizierbare Nierenzellkarzinome eingeordnet [8].

Tumoren mit sarkomatoiden Anteilen sind in der Regel lokal weit fortgeschritten und weisen ein ausgeprägtes invasives Wachstum auf. Die sarkomatoiden Areale sind weißlich, von derber Konsistenz, häufig mit schlecht definierten Tumorgrenzen [7] [8].

Histologisch sind diese Tumoren aufgebaut aus in Wirbeln angeordneten Faszikeln spindeliger Zellen, meist mit ausgeprägten Zell- und Kernpleomorphien. Mehrkernige Tumoriesenzellen können vorkommen. Dadurch können diese dedifferenzierten Anteile morphologisch bösartigen mesenchymalen Tumoren (Sarkomen) sehr ähnlich sehen, woher die Bezeichnung sarkomatoid (sarkomähnlich) stammt. Sowohl der immunhistochemische Nachweis epithelialer Marker als auch elektronenmikroskopischer Nachweis von Desmosomen belegen die epitheliale Natur der Spindelzellen und erklären somit die Einordnung als Karzinom [7]. Sarkomatoide Karzinome sind extrem proliferationsaktiv mit einem rapiden Wachstums- und Metastasierungsverhalten.

Das Verhältnis von differenzierten Anteilen zu dedifferenziert-sarkomatoiden Anteilen kann in Nierenzellkarzinomen erheblich variieren und beeinflusst die Prognose stark. Je größer die sarkomatoiden Anteile, desto schlechter die Prognose [7].

Immunhistochemisch können sarkomatoide Karzinome sehr unterschiedliche Antigenexpressionen zeigen. Einige Karzinome können unverändert das Antikörperprofil der differenzierten Tumorteile, aus denen sie entstanden sind, aufweisen. Nicht selten verlieren diese Tumoren aber ihre Positivität für die epithelialen Marker (Zytokeratine), meist bei weiterhin bestehender stark positiver Reaktivität für Vimentin [11].

1.3.4 Onkozytome

Onkozytome sind seltene gutartige epitheliale Tumoren der Niere, die weniger als 5 % aller Nierentumoren des Erwachsenen ausmachen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der 7. Lebensdekade. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. [8].

Onkozytome sind meist aus soliden Nestern aufgebaut, der vorherrschende Zelltyp sind

sog. Onkozyten (oncozyt = geschwollene Zelle), große Zellen mit mitochondrienreichem, granulärem eosinophilem Zytoplasma und kleinen, runden, monomorphen Kernen [7] [8] (Abbildung 1.8).

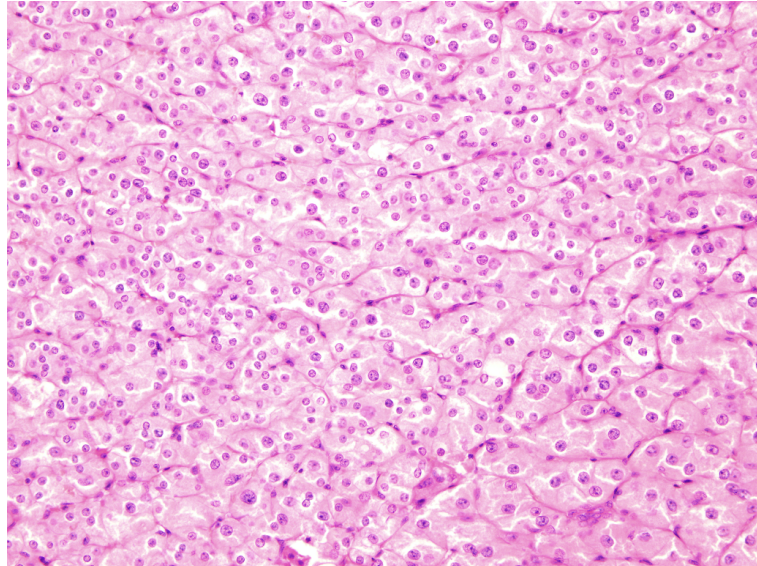


Abbildung 1.8: Histologischer Aspekt eines Onkozytoms

Die Ursprungszellen der Onkozytome scheinen die Zwischenzellen (intercalated cells) des distalen Tubulussystems und der Sammelrohre zu sein. Diese spezialisierten Wandzellen dienen der Aufrechterhaltung des pH-Wertes [8] [7].

Makroskopisch sind Onkozytome meist solitäre, nicht bekapselte aber gut umschriebene Tumoren mit rehbrauner Schnittfläche und zentraler Narbe. Einblutungen und Nekrosen sind selten.

Verschiedene chromosomale Aberrationen wurden beschrieben, die häufigsten sind Verluste der Chromosomen 1 und y sowie Deletionen auf Chromosom 14 und Rearrangements auf Chromosom 11q13 [7] [29].

Obwohl in Einzelfällen ein mikroskopisches kapselüberschreitendes Wachstum in das perirenale Fettgewebe und sogar mikroskopische Angioinvasionen beschrieben wurden, wird das Onkozytom den gutartigen Tumoren zugeordnet, da es weltweit keinen einzigen dokumentierten Fall eines metastasierten Onkozytoms oder an einem Onkozytom verstorbenen Patienten gibt [8].

1.3.5 Das Fuhrman-Grading

Die Tumorzellkerne von Nierenzellkarzinomen können in Größe, Form, Chromatinstruktur und Nukleolengröße von Fall zu Fall deutlich variieren. Die Kernmorphologie ist neben dem

Tumorstadium bei Diagnosestellung der wichtigste Prognosefaktor und wird durch das Kerngrading nach Fuhrman wiedergegeben.

Tabelle 1.2: Das Kerngrading nach Fuhrman [27]

	Kerndurchmesser	Kernform	Chromatin	Nukleolen
Grad 1	$< 10\mu\text{m}$	rund, monomorph	kompakt	unauffällig
Grad 2	$15\mu\text{m}$	rund, monomorph	fein granulär	nicht sichtbar bei x10
Grad 3	$20\mu\text{m}$	rund, teilweise irregulär	grob granulär	sichtbar bei x10
Grad 4	$> 20\mu\text{m}$	pleomorph, gelappt, bizarr	hyperchromatisch	riesig

In Tabelle 1.2 werden die typischen Charakteristika der 4 Grade nach Fuhrman gezeigt. Grad 1-Tumoren haben kleine, runde und chromatindichte (kondensierte) Kerne ohne sichtbare Nukleolen. Die Kerne von Grad 2-Tumoren sind etwas größer als von Grad 1-Tumoren und nicht mehr „perfekt rund“. Das Chromatin ist fein granulär. Die Nukleolen sind rudimentär und wenn überhaupt, dann nur bei großer Vergrößerung (40x), auf keinen Fall aber bei 10x sichtbar. Die Kerne von Grad 3-Tumoren sind noch größer, nun schon mehr als doppelt so groß wie in Grad 1-Tumoren, und mäßig pleomorph. Das Chromatin ist grob granulär und Nukleolen sind schon in der 10x-Vergrößerung deutlich zu erkennen. Der Tumorgrad 4 zeichnet sich durch eine deutliche Kernpleomorphie aus, die Kerne sind hyperchromatisch, das Chromatin teilweise klumpig. Die Kerne haben riesige „Makronukleolen“, auch mehrere Nukleolen pro Zellkern können vorkommen.

Mitosen kommen in den Kerngraden 1 und 2 so gut wie nicht vor, während sie in den Kerngraden 3 und 4 regelmäßig zu finden sind [27] [7].

Viele Tumoren zeigen eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich ihres Kerngrades, hier bestimmen die am schlechtesten differenzierten Areale den entsprechenden Kerngrad, wobei die Größe eines solchen schlecht differenzierten Areals mindestens ein hochauflösendes Gesichtsfeld betragen sollte [7].

In einer Studie von Ficarra et al. 2001 konnte belegt werden, dass der Kerngrad einen bedeutenden Prognosefaktor für das Nierenzellkarzinom darstellt. Es wurden retrospektiv von 333 Patienten, welche im Zeitraum von 1983-1999 an einem Nierenzellkarzinom erkrankten, die Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Kerngrad nach Fuhrman untersucht. Die krankheitsspezifischen 5-Jahresüberlebensraten betrugen bei G1-Tumoren 94%, bei G2-Tumoren 86%, bei G3-Tumoren 59% bei G4-Tumoren 31% [24] [7].

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Erforschung der prognostischen Bedeutung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM in Nierenzellkarzinomen findet sich in der internationalen Literatur kaum. Die wenigen Arbeiten zu diesem Thema wurden in der Mehrzahl an kleineren Tumorkollektiven durchgeführt.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Analyse eines großen Kollektivs aller histologischen Varianten von Nierenzellkarzinomen hinsichtlich ihrer EpCAM-abhängigen Prognose.

Hierbei wurde die Tissue-Micro-Array-Technik verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Tumorkollektiv

Da EpCAM ein epitheliales Molekül ist (s.o.), welches von nichtepithelialen Tumoren nicht exprimiert wird, haben wir in unserer Arbeit ausschließlich epitheliale Nierentumoren (Nierenzellkarzinome, Onkozytome) untersucht.

Nichtepitheliale Tumoren, intrarenale Urothelkarzinome des Nierenbeckens sowie Metastasen anderer Tumoren in der Niere waren nicht Gegenstand unserer Arbeit.

Es wurden insgesamt 948 Patienten mit primären epithelialen Nierentumoren auf insgesamt 28 Tissue-Micro-Arrays untersucht. 523 Tumoren davon wurden in den Jahren 1998 bis 2012 in Rostock operiert und im Institut für Pathologie der Universität Rostock diagnostiziert. 425 Tumoren stammten aus der Charité Berlin, wo sie in den Jahren 1992 bis 2004 operiert und diagnostiziert wurden.

Dieses Patientenkollektiv besteht aus 632 (67,1 %) Männern und 310 (32,9%) Frauen (in 6 Fällen keine Angabe zum Geschlecht) im Alter von 16 - 89 Jahren (mittleres Erkrankungsalter 63,5 Jahre). Bei 703 (87,4%) Patienten wurde eine Tumornephrektomie durchgeführt, bei 194 (21,6%) Patienten eine nierenerhaltende Tumorexzision. Bei den restlichen 51 Patienten lagen uns keine Angaben über die durchgeführten chirurgischen Maßnahmen vor.

Von diesen 948 Tumoren waren 649 (68,5%) klarzellige NZK, 155 (16,4 %) papilläre NZK, 69 (7,3%) chromophobe NZK und 45 (4,7 %) Onkozytome. Die restlichen 30 (3,2 %) Tumoren wurden den nicht weiter klassifizierbaren Nierenzellkarzinomen sowie seltenen Entitäten (z.B. Sammelrohrkarzinome) zugeordnet.

Die Tumoren hatten eine Größe von 5 mm bis 220 mm (im Mittel 54,3 mm) und wurden in den meisten Fällen im Stadium I oder II operiert. Fast 80% aller Tumoren entsprachen dem Fuhrman Kerngrad 2 oder 3.

Das Staging der untersuchten Tumoren anhand der TNM-Klassifikation ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen, welche die absoluten und die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Tumorentitäten, die Stadien der TNM-Klassifikation, den jeweiligen R-Status, den Kerngrad nach Fuhrman sowie die Größen der untersuchten Tumoren zum Zeitpunkt der Operation zeigt.

Tabelle 2.1: Tumorkollektiv

Tumoren		948
	klarzellige NZK	649 (68,5%)
	papilläre NZK	155 (16,4%)
	chromophobe NZK	69 (7,3%)
	Onkozytome	45 (4,7%)
	seltene + unklassifizierbare NZK	30 (3,2%)
T-Stadium		895
	1	532 (59,4%)
	2	60 (6,7%)
	3	281 (31,4%)
	4	22 (2,5%)
N-Stadium		441
	0	390 (88,4%)
	1	32 (7,3%)
	2	19 (4,3%)
M-Stadium		350
	0	291 (83,1%)
	1	59 (16,9%)
R-Stadium		869
	0	822 (94,6%)
	1	45 (5,2%)
	2	2 (0,2%)
Kerngrad (Fuhrman)		948
	1	99 (10,4%)
	2	544 (57,4%)
	3	210 (22,2%)
	4	95 (10,0%)
Tumorgröße		
	gesamt	5mm - 220mm
	im Mittel	54,3mm

2.2 Die Tissue-Micro-Array-Technik

Ein Tissue-Micro-Array (TMA) dient der gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Gewebeproben. Dabei werden aus unterschiedlichen Paraffinblöcken Gewebezylinder ausgestanzt und in einem neuen Paraffinblock wieder zusammengesetzt. Je nach Durchmesser der Stanzen können bis über 400 Proben auf einem Standardobjektträger (76cm x 26cm [5]) aufgebracht und gleichzeitig histomorphologisch untersucht werden. Auch immunhistochemische Färbungen sind möglich, die Untersuchungen mehrerer Proben mit nur einmaliger Antikörpergabe spart dabei sowohl Material als auch Zeit des Untersuchenden[39][15].

2.3 Herstellung der Tissue-Micro-Arrays der Rostocker Fälle

Zuerst erfolgte die Erfassung der untersuchungsrelevanten Fälle aus dem institutsinternen Archivierungs- und Dokumentationssystem Pathix sowie das Heraussuchen der Schnitt- sowie der Blockpräparate aus den jeweiligen Archiven.

Da mit der Zeit die Qualität der Färbungen der Schnittpräparate zum Teil deutlich nachgelassen hatte, wurden von einigen Blockpräparaten neue HE-gefärbte Großflächenschnitte angefertigt. Bei Notwendigkeit erfolgte eine Reevaluierung der Nierenzellkarzinome hinsichtlich des histologischen Gradings durch einen erfahrenen Facharzt der Pathologie (Frau Dr. A. Zimpfer - Institut für Pathologie der Universität Rostock). Die Tumoreareale, welche später ausgestanzt werden sollten, wurden auf diesen Schnitten gekennzeichnet. Diese Kennzeichnung ermöglichte eine Orientierung auf dem dazugehörigen Paraffinblock, an welcher Stelle im Block sich am Ehesten verwertbares Tumormaterial befindet (Abbildung 2.1). Dadurch sollte vermieden werden, dass versehentlich nekrotische oder stark eingeblutete Tumoreareale oder Areale mit tumorfreiem Normalgewebe, welche jeweils für die immunhistochemische Auswertung ungeeignet gewesen wären, gestanzt wurden.

Aus den passenden Gewebestücken wurden dann aus dem Bereich der gekennzeichneten Tumoreareale 0,6 mm durchmessende Gewebestangen mittels des Manual Tissue Arrayers (Abbildung 2.2) ausgestanzt und in vorher definierte Positionen in einem Empfängerparaffinblock eingebracht (Abbildung 2.3 - 2.6). Von jedem Tumor wurden, soweit möglich, vier Stanzen Tumorgewebe sowie eine Stanze tumorfreies Normalgewebe entnommen.

War kein Normalgewebe mehr vorhanden, wurden fünf Stanzen Tumorgewebe gestanzt.

Bei den vorbestehenden 14 Arrays aus dem Institut für Pathologie der Charité Berlin wurden 1,0 mm durchmessende Gewebestangen verwendet und dreimal Tumorgewebe und zweimal tumorfreies Nierenparenchym pro Patient gestanzt.

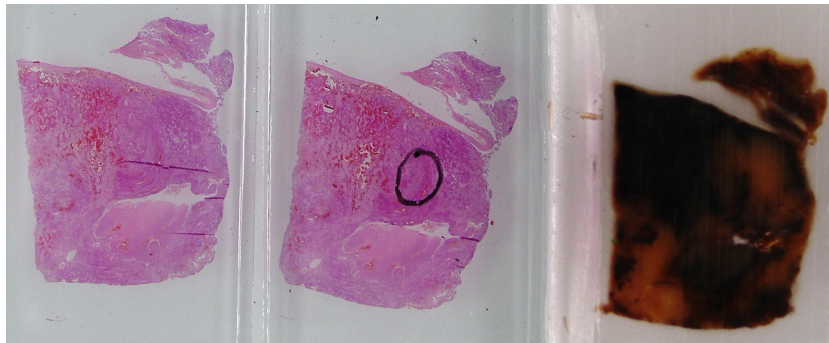


Abbildung 2.1: Großflächenschnitt eines Nierenzellkarzinoms (links), mit Markierung eines geeigneten Tumorareals (Mitte) sowie der dazugehörige Paraffinblock (rechts)

Kommentar zu den Abbildungen 2.2 - 2.6: Die Abbildung 2.2 zeigt den Manual Tissue Arrayer MTA-1 der Firma Beecher Instruments Inc. Der Grundplatte aufliegend ist die Haltevorrichtung für den Empfängerblock (hier bereits eingespannt) zu sehen. Darüber, befestigt am Stanzenarm, zwei Hohnadeln (Stanzen) mit definiertem Durchmesser. Die linke, rote Stanze dient dem Ausstanzen eines Paraffinzyinders aus dem Empfängerblock. Die rechte, blaue Stanze dient dem Ausstanzen eines Gewebezylinders aus dem Donorblock und dem Einbringen dieses Zylinders in den vorher geschaffenen Stanzenkanal im Empfängerblock. Dazu wird der Stanzenarm mit den Stanzen manuell nach unten in die jeweiligen Paraffinblöcke gedrückt und danach über einen Spannfedermechanismus wieder in die alte Position gebracht. Der gesamte Stanzenarm kann sowohl nach rechts und links als auch nach vorne und hinten millimetergenau mittels der seitlichen (rechts im Bild) und der hinteren (vom Stanzenarm verdeckt) Stellschraube bewegt werden.

Die Abbildungen 2.3 - 2.6 zeigen die einzelnen Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA. Abbildung 2.3 und 2.4 zeigen das Ausstanzen des Stanzenkanals im Empfängerblock, Abbildung 2.5 zeigt den Donorblock und das Ausstanzen der Gewebestanze, Abbildung 2.6 das Einbringen dieser Gewebestanze in den Empfängerblock.

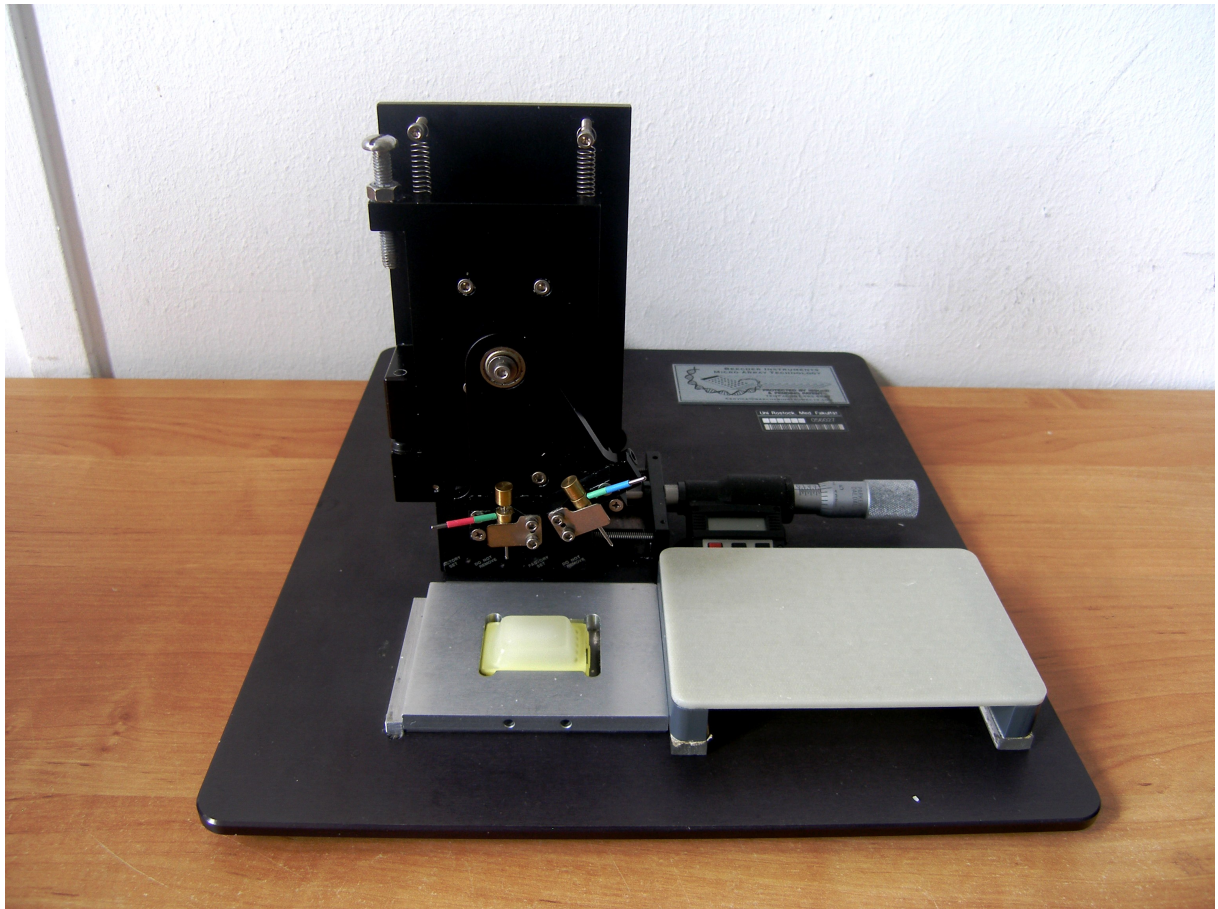


Abbildung 2.2: Manual-Tissue-Arrayer

Kommentar zur Abbildung 2.7 - 2.9: Die Abbildung 2.7 zeigt schematisch die Anordnung der einzelnen Gewebestanzungen bei einem Array mit 25 untersuchten Tumoren. Unten links befindet sich die Position 1.1, wo die erste Tumorstanzung des ersten zu untersuchenden Tumors eingebracht wird. Dann folgen darüber drei weitere Positionen (1.2 - 1.4) für Tumorgewebe dieses Patienten und eine Position (1.5) für Normalgewebe. Darüber folgen dann mit etwas Abstand, die nächsten 5 Positionen (2.1 - 2.5) für den nächsten Patienten. Danach wird wieder von unten angefangen mit dem 3. Patienten. Zur besseren Orientierung am später angefertigten Schnittpräparat wird die Nummer 25 ausgelassen um ein nicht-symmetrisches Schema zu erhalten.

Die Abbildungen 2.8 und 2.9 zeigen den fertigen Paraffinblock sowie das dazugehörige Schnittpräparat eines TMA mit 41 gestanzten Tumoren.

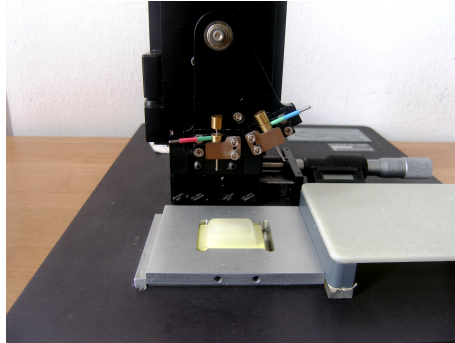


Abbildung 2.3: Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA

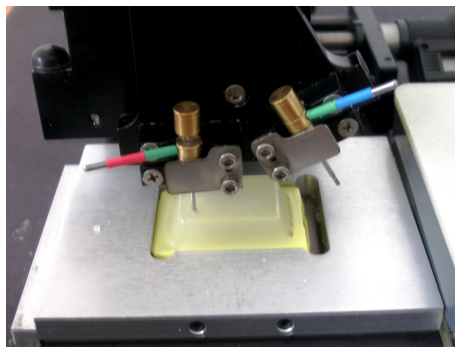


Abbildung 2.4: Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA

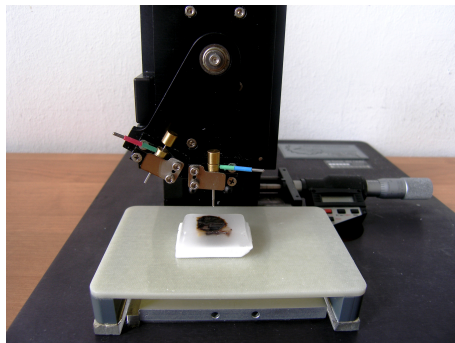


Abbildung 2.5: Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA

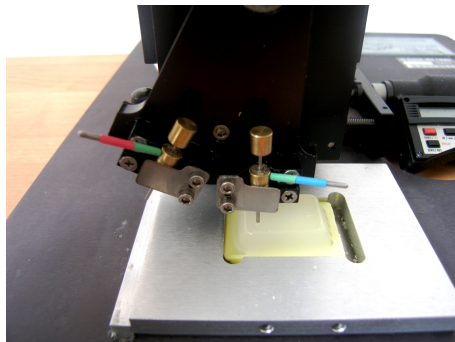


Abbildung 2.6: Arbeitsschritte bei der Anfertigung eines TMA

5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26														
5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23														

Abbildung 2.7: Schema der Nieren-TMA Rostock und Berlin

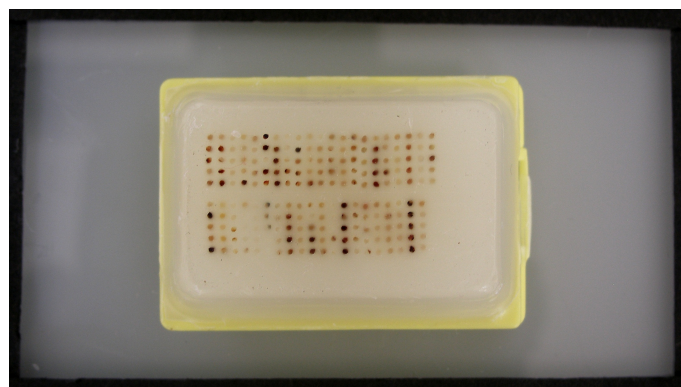


Abbildung 2.8: Fertiger Array mit 41 gestanzten Tumoren

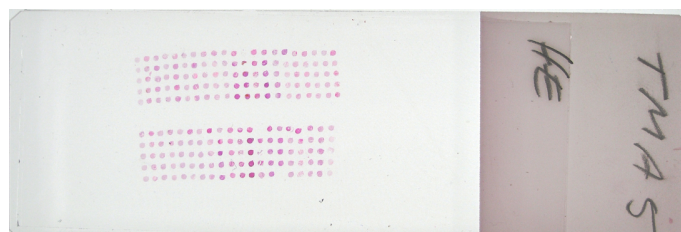


Abbildung 2.9: HE-gefärbtes Schnittpräparat eines TMA mit 41 gestanzten Tumoren

2.4 Anfertigung der Schnittpräparate

Vor dem Schneiden wurden die angefertigten Tissue-Micro-Array-Blöcke für ca. 60 Minuten bei 40°C erwärmt, wodurch das Paraffin etwas weicher wurde und die eingebrachten Gewebestanden besser am Paraffinmaterial haften konnten. Danach wurden mittels Gewebemikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt, wobei die Schnitte direkt auf beschichtete Objektträger (IHC Microscope Slides, FLEX - Dako) aufgezogen und eingedeckelt wurden.

Nach der Fertigstellung der Schnittpräparate wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und lichtmikroskopisch hinsichtlich der Verwertbarkeit der einzelnen Stenzen ausgewertet.

Mindestens 10 % repräsentatives Tumorgewebe musste in den drei bzw. vier Tumorstenzen vorhanden sein damit der entsprechende Fall von uns analysiert und ausgewertet werden konnte.

2.5 EpCAM-Immunhistochemie

Das Prinzip immunhistochemischer Färbemethoden beruht darauf, dass spezielle Proteine (Antigene) sichtbar gemacht werden. Dieses wird mit Antikörpern, welche eine möglichst hohe Affinität zum gesuchten Antigen aufweisen und mit diesem einen Antigen-Antikörperkomplex bilden, erreicht. Diese Antikörper werden Primärantikörper genannt. Das Sichtbarmachen wird durch ein Färbereagenz (spezielle Enzyme oder andere meist fluoreszierende Farbstoffe) erreicht, welches entweder direkt am primären Antikörper gebunden ist (direkte Immunfluoreszenz) oder an einen sekundären Antikörper gebunden ist, welcher dann an den Antigen-Antikörper-Komplex bindet (indirekte Immunfluoreszenz). Nur wenn das nachzuweisende Antigen auch wirklich vorhanden ist und mit dem primären Antikörper Komplexe bildet, wird ein spezifisches Farbsignal ausgelöst. Die heutzutage verwendeten Antikörper werden meist aus Mäusen (monoklonal) oder aus Kaninchen (polyklonal) gewonnen. So auch die Antikörper gegen das Antigen EpCAM.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Institut für Pathologie der Universität Rostock durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen; Klon: Ber-EP4; Isotyp: IgG1, Kappa der Firma Dako verwendet. Die Färbung erfolgte im Autostainer LINK 48 unter Verwendung des Envision FLEX K8000 - Systems der Firma Dako. Vor der Färbung wurden die paraffineingebetteten Gewebeschnitte 20 Minuten lang bei 97°C mit der EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (pH9)-Arbeitslösung (DM828) entparaffinisiert, rehydriert und demaskiert. Endogene Peroxidase wurde mit EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) geblockt.

Zur Färbung wurde ein Substratsystem, bestehend aus einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (EnVision FLEX DAB + Chromogen (DM827)) verdünnt mit EnVision FLEX

Substrat Buffer (SM803) verwendet. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Envision FLEX Hematoxylin (K8008).

2.5.1 Definition EpCAM-Expression

Als EpCAM-Expression wurde eine spezifische membranöse Farbreaktion in mindestens 5% der Tumorzellen definiert.

Als EpCAM-Überexpression wurde ein Färbescore von >4 festgelegt. Das Scoringssystem setzt sich aus dem prozentualen Anteil der Tumorzellen mit positiver Farbreaktion sowie der jeweiligen Färbeintensität zusammen (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Färbescore EpCAM-Immunhistochemie

Anteil (%)	Punktzahl		Färbeintensität	Punktzahl
0% der Tumorzellen	0			
<10% der Tumorzellen	1		schwache Färbeintensität	1
10-50% der Tumorzellen	2		mäßige Färbeintensität	2
51-80% der Tumorzellen	3		starke Färbeintensität	3
>80% der Tumorzellen	4			

Das Produkt der Punkte des prozentualen Anteils der positiven Tumorzellen sowie der Färbeintensität ergibt den letztendlichen Färbescore (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Färbescore EpCAM-Immunhistochemie

Färbescore	Expressionsstärke
0	keine EpCAM-Expression
1-4	schwache EpCAM-Expression
5-8	moderate EpCAM-Expression
9-12	starke EpCAM-Expression

Hierbei wurden, wie oben bereits erwähnt, Tumoren mit moderater und starker Expression (Färbescore >4), als Tumoren mit EpCAM-Überexpression zusammengefasst und teilweise separat von Tumoren mit schwacher Expression untersucht.

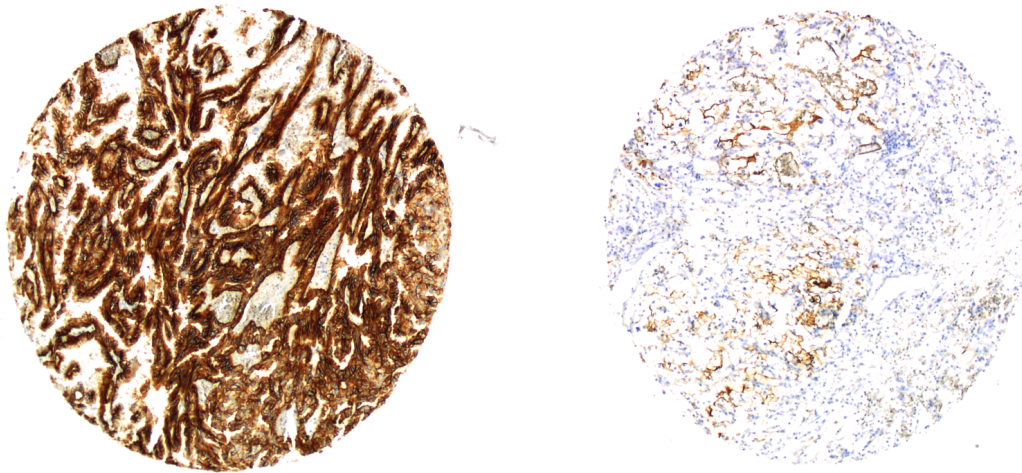


Abbildung 2.10: Stanzen (EpCAM) mit Geweben zweier klarzelliger Nierenzellkarzinome

Kommentar zur Abbildung 2.10: Die Abbildung zeigt zwei Stanzen unterschiedlicher Tumoren, die linke Stanze zeigt eine starke membranöse Färbung nahezu aller Tumorzellen (Färbescore 12 - starke EpCAM-Expression (EpCAM-Überexpression)), die rechte Stanze zeigt eine mäßige membranöse Färbeintensität in etwa 10 % der Tumorzellen (Färbescore 4 - schwache EpCAM-Expression).

2.6 Klinische Verläufe

Nach Herstellung der Tissue-Micro-Arrays, Anfertigung und Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate wurden die klinischen Verläufe, das progressionsfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit der Patienten aus dem klinischen Krebsregister Rostock herausgesucht (Frau A. Litzenberger) und mit der EpCAM-Expression korreliert.

Es wurde geprüft, wieviele Patienten zum Zeitpunkt der Auswertung noch lebten. Bei bereits verstorbenen Patienten, unabhängig davon, ob sie an den Folgen ihrer Tumorerkrankung verstarben oder nicht, wurden die Monate zwischen Diagnosestellung und letztmaligem Lebensnachweis als Gesamtüberlebenszeit gewertet.

Von den meisten Fällen aus dem Institut für Pathologie an der Berliner Charite lagen uns keine klinischen Daten vor.

2.7 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mittels SPSS (Statistical Package of Social Sciences 22.0) durchgeführt.

Das progressionsfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit wurden mittels Kaplan-Meier-Methode analysiert und mittels log-rank-test verglichen.

Cox-Regressions-Analysen deckten Zusammenhänge unterschiedlicher Faktoren und der Expression von EpCAM auf, welche das progressionsfreie Überleben sowie die Gesamtüberlebenszeit der Patienten beeinflussen.

Korrelationen zwischen der EpCAM-Expression der Nierentumoren und verschiedenen klinischen und pathologischen Parametern wurden mittels des Pearsonschen Chi-Quadrat-Tests demonstriert.

$P < 0,05$ wurde als signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologische Auswertung

Zuerst wurden die HE-gefärbten Schnittpräparate der 28 Tissue-Micro-Arrays lichtmikroskopisch hinsichtlich der Menge und Verwertbarkeit des Tumorgewebes untersucht. Mindestens 10% Tumorgewebe wurden als notwendig erachtet, um eine adäquate Bearbeitung und Auswertung des Falles durchführen zu können und für diesen Tumor repräsentative Ergebnisse zu erlangen. In 927/948 Fällen (97,8%) lag 10 % oder mehr Tumorgewebe vor. In 21 Fällen war nicht ausreichend repräsentatives Tumormaterial vorhanden, ursächlich hierfür waren Nekrosen oder Fibrosierungen des Tumors, stärkergradige Einblutungen sowie komplettes Fehlen von Tumorgewebe in den Stanzen (empty-spots).

3.1.1 EpCAM-Expression der unterschiedlichen Entitäten

Insgesamt zeigten 443 unser 948 untersuchten Tumoren (46,7%) eine EpCAM-Expression, 497 Tumoren zeigten keinerlei Färbereaktion. Acht Tumoren (sieben klarzellige NZK, ein nicht klassifizierbares NZK) konnten nicht ausgewertet werden.

Bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten 233/642 (36,3 %) Tumoren eine EpCAM-Expression (Abbildung 3.1 - 3.2), bei den papillären Nierenzellkarzinomen 126/155 (81,3%), bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen 54/68 (79,4%) und bei den seltenen bzw. unklassifizierbaren Nierenzellkarzinomen 13/30 (43,3%) (Tabelle 3.1).

Papilläre Nierenzellkarzinome vom eosinophilen bzw. basophilen Subtyp hatten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer EpCAM-Expression.

Bei den Onkozytomen wiesen 17/45 (37,8%) eine membranöse Anfärbbarkeit auf. Mit $p < 0,001$ sind die Unterschiede der EpCAM-Expression in den unterschiedlichen Tumorentitäten der Niere statistisch signifikant.

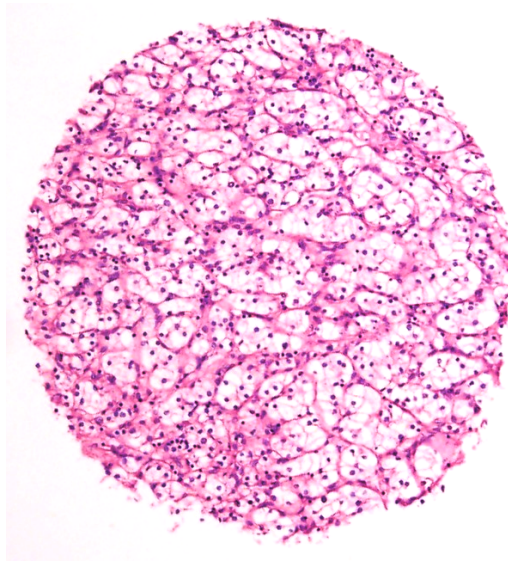


Abbildung 3.1: Stanze (HE) mit Gewebe eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms

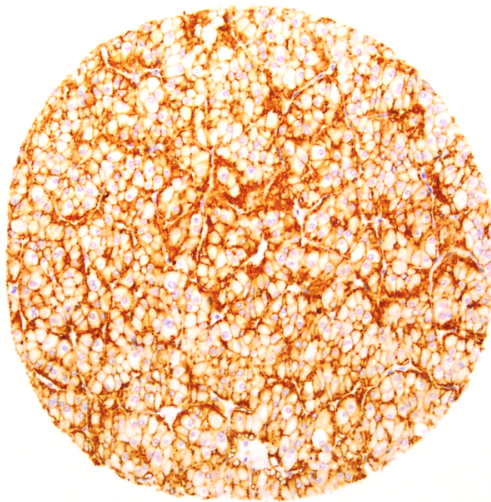


Abbildung 3.2: Stanze (EpCAM) mit Gewebe eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Kommentar zur Abbildung 3.1 - 3.2: Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen jeweils Stanzen des gleichen klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Die erste Stanze (3.1) ist HE-gefärbt, die zweite Stanze (3.2) zeigt die dazugehörige EpCAM-Immunhistochemie mit deutlicher membranöser Färbereaktion nahezu aller Tumorzellen.

Tabelle 3.1: EpCAM-Expression der unterschiedlichen Nierentumoren

Entität	EpCAM-Positivität	EpCAM-Negativität
klarzellige NZK	233/642 (36,3%)	409/642 (63,7%)
papilläre NZK	126/155 (81,3%)	29/155 (18,7%)
chromophobe NZK	54/68 (79,4%)	14/68 (20,6%)
Onkozytome	17/45 (37,8%)	28/45 (62,2%)
seltene + unklass. NZK	13/30 (43,3%)	17/30 (56,7%)

Das tumorfreie Nierengewebe zeigte die typische Expression von EpCAM in den Tubuli und im Sammelrohrsystem mit Negativität in den Glomeruli mit den Kapillarschlingen (siehe Diskussionsteil).

3.1.2 Expressionsstärken der einzelnen Entitäten

Die papillären und chromophoben Nierenzellkarzinome waren nicht nur die Entitäten mit den prozentual häufigsten EpCAM-Expressionen, auch die Stärke der jeweiligen Ausprägung war in diesen Entitäten am höchsten. So zeigten 93 der insgesamt 126 EpCAM-positiven papillären Nierenzellkarzinome eine moderate bis starke Färbintensität, dieses entspricht einem prozentualen Anteil von 74,6% (60,0 % aller papillären NZK), bei den chromophoben Karzinomen waren es sogar 75,9% (41/54) der EpCAM-positiven Tumoren (60,3% aller chromophoben Karzinome).

Bei den klarzelligen NZK, bei denen mit 233/642 (36,3%) ansich schon nur etwa ein Drittel der Tumoren überhaupt eine Färbereaktion zeigte, war diese bei den meisten dieser Tumoren dann auch nur schwach ausgeprägt ($144/233 = 61,8\%$). Nur 28 klarzellige NZK zeigten eine starke Expression, dieses entspricht 12,0% der positiven Tumoren und nur 4,4% aller untersuchten klarzelligen NZK.

Auch bei den Onkozytomen zeigte der Großteil der positiven Tumoren eine schwache bis allenfalls mäßige Färbintensität (12/17 positiven Tumoren = 70,6%).

Tabelle 3.2 führt die unterschiedlichen Expressionsstärken der einzelnen Nierentumoren und den prozentualen Anteil zum Gesamtkollektiv der einzelnen Tumorentitäten auf.

Tabelle 3.2: EpCAM-Expressionsstärke der unterschiedlichen Nierentumoren

Entität	schwache Expression	moderate Expression	starke Expression
klarzellige NZK	144 (22,4%)	61 (9,5%)	28 (4,4%)
papilläre NZK	33 (21,3%)	48 (31,0%)	45 (29,0%)
chromophobe NZK	13 (19,1%)	18 (26,5%)	23 (33,8%)
Onkozytome	8 (17,8%)	4 (8,9%)	5 (11,1%)
seltene + unklass. NZK	3 (10,0%)	7 (23,3%)	3 (10,0%)

3.1.3 EpCAM-Expression in Bezug zum Differenzierungsgrad

Hinsichtlich des Differenzierungsgrades der Tumoren, dargestellt durch das Kerngrading nach Fuhrman, zeigte sich, unabhängig von der Tumorentität, ein prozentualer Anstieg der EpCAM-Expression von Grad I nach Grad III, hier auch mit prozentualem Anstieg der mäßigen und starken Expressionsintensitäten. So zeigten 21 der 96 auswertbaren Grad I-Tumoren (21,9 %) eine EpCAM-Expression, von denen lediglich 7 Tumoren (33,3%) eine mäßige bis starke Expression aufwiesen. Bei Grad II-Tumoren waren es 269 der 542 auswertbaren Fälle (49,3%), von denen 150 Tumoren (55,8%) eine mäßige oder starke Expression zeigten. Bei Grad III-Tumoren waren es sogar 119 der 208 auswertbaren Fälle (57,2 %), die eine EpCAM-Expression aufwiesen, 71 hiervon (59,7%) eine mäßige oder starke.

Bei weiterer Dedifferenzierung (Fuhrman Grad IV) war dann ein deutlicher Abfall der EpCAM-Expressionen und deren Intensitäten zu verzeichnen. 34 der 94 auswertbaren Tumoren (36,2%) zeigten eine Expression, 20 (58,8%) hiervon dann auch nur mit schwacher Färbeintensität (Abbildung 3.3).

Mit $p < 0,01$ sind auch die Unterschiede zwischen der EpCAM-Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors signifikant.

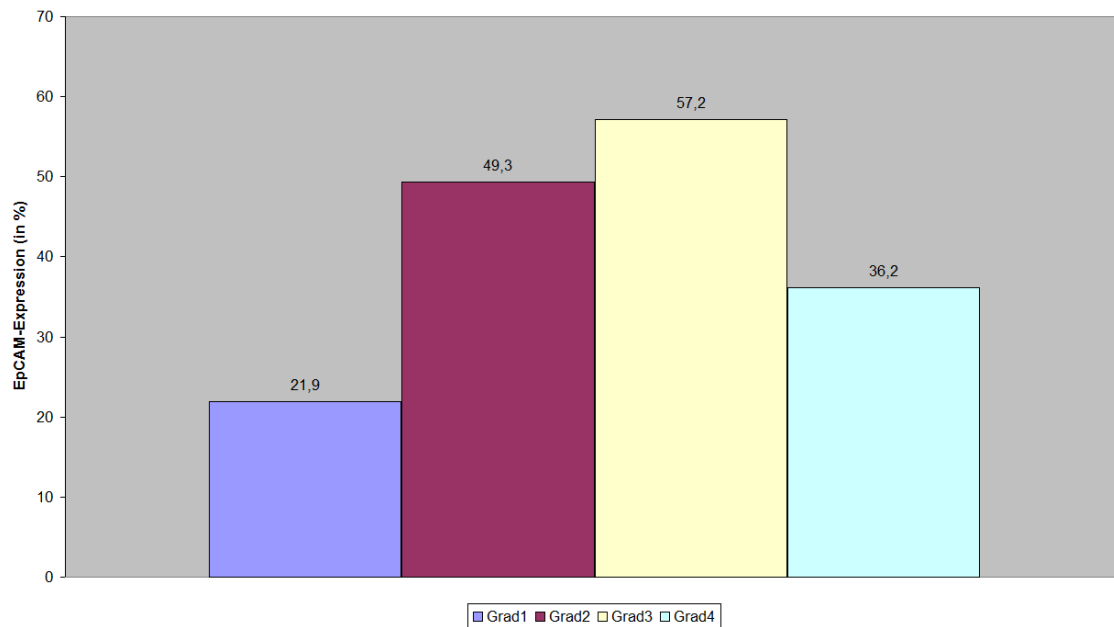


Abbildung 3.3: EpCAM-Expression aller Nierentumorentitäten in Bezug zum Differenzierungsgrad (nach Fuhrman)

3.1.4 EpCAM-Expression in Bezug zur regionalen Ausdehnung des Primärtumors

Hinsichtlich der Ausdehnung des Tumors zeigte sich ein signifikanter Abfall der EpCAM-Expressionen in den als pT3 und pT4 klassifizierten Tumoren, also denjenigen Tumoren, die nicht mehr ausschließlich auf die Niere begrenzt waren, sondern ins perirenale Fettgewebe, ins Nierenbecken oder peripelvine Fettgewebe, in größere Nierenvenenäste oder über die Gerota-Fascie hinaus infiltrierten.

So zeigten 295 der 586 (50,3 %) auswertbaren pT1- und pT2-Tumoren eine EpCAM-Expression, 161 hiervon (54,6%) mit mäßiger oder starker Intensität. Bei den 280 auswertbaren pT3-Tumoren zeigten nur noch 121 (43,2%) eine Expression von EpCAM, 67 hiervon (55,4 %) mit mäßiger oder starker Intensität. Bei den 22 auswertbaren pT4-Tumoren waren nur noch 6 (27,3%) positiv für EpCAM, die Hälfte hiervon zeigte noch eine mäßige Intensität, kein einziger Fall eine stark ausgeprägte Expression (Abbildung 3.4).

Mit $p=0,011$ sind die Unterschiede zwischen der EpCAM-Expression und der Ausdehnung des Primärtumors statistisch signifikant.

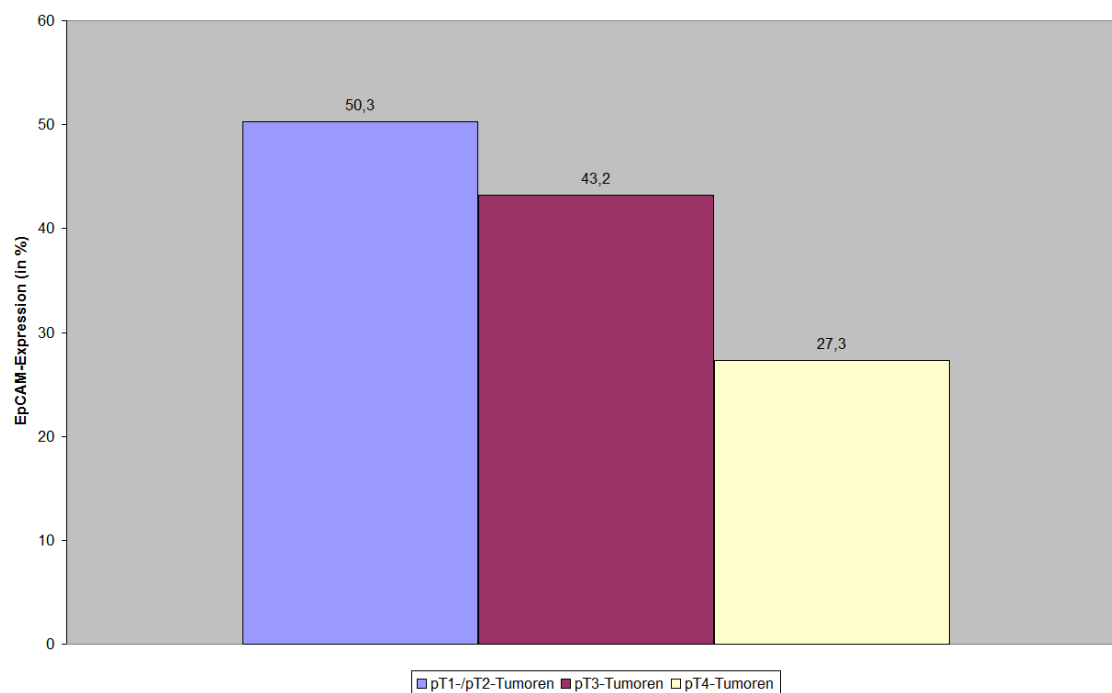


Abbildung 3.4: EpCAM-Expression aller Nierentumorentitäten in Bezug zur Ausdehnung des Tumors bei Diagnosestellung

3.1.5 EpCAM-Expression in Bezug zum Nodalstatus sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression nodal positiver Tumoren oder Tumoren mit Fernmetastasen zum Operationszeitpunkt im Vergleich zum Gesamtkollektiv.

3.2 Überlebensanalyse

3.2.1 Überlebenszeit, unabhängig von der EpCAM-Expression

Klinische Follow-up Daten lagen uns insgesamt von 686 der 948 Fälle vor.

Zum Zeitpunkt unserer Analyse waren 246 der 686 Patienten bereits verstorben, 440 Patienten lebten noch zum Zeitpunkt der letzten Abfrage.

Wie bereits erwähnt, wurden als Gesamtüberlebenszeit die Monate zwischen Diagnosestellung und Tod bzw. zwischen Diagnosestellung und letztmaligem Lebensnachweis gewertet.

Die Gesamtüberlebenszeit nach Diagnosestellung betrug zwischen 1 und 177 Monaten (im Mittel 54 Monate), das progressionsfreie Überleben zwischen 2 und 153 Monaten (im Mittel 51,9 Monate)(Tabelle 3.3). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit von der Entität des Primärtumors, einzig bei Patienten mit unklassifizierbaren Nierentumoren war ein deutlicher Abfall der Überlebenszeit zu verzeichnen. So betrug bei Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen die mittlere Gesamtüberlebenszeit 70,5 Monate, 61,9 Monate bei Patienten mit papillären Nierenzellkarzinomen und 65,3 Monate bei Patienten mit chromophoben Nierenzellkarzinomen. Patienten mit unklassifizierbaren Nierenzellkarzinomen lebten durchschnittlich nur noch 22,5 Monate nach Diagnosestellung. Lediglich bei 4 Patienten mit der Diagnose eines Onkozytoms lagen uns klinische Follow-up Daten hinsichtlich des Überlebens vor, aus denen sich eine durchschnittliche Überlebenszeit von 54,8 Monaten ergab.

Hinsichtlich des Differenzierungsgrades der Tumoren ergab sich ein kontinuierlicher Abfall der mittleren Gesamtüberlebenszeit von Fuhrman-Grad I- und II -Tumoren (75,4 Monate) zu Grad 3-Tumoren (57,9 Monate) bzw. Grad IV-Tumoren (30,3 Monate).

Tabelle 3.3: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberlebenszeit aller Patienten

Gesamtüberleben		
	gesamt	1 Monat - 177 Monate
	im Mittel	54 Monate
Progressionsfreies Überleben		
	gesamt	2 Monate - 153 Monate
	im Mittel	51,9 Monate

3.2.2 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression

Unabhängig von der Tumorentität zeigten Kaplan-Meier-Analysen sowie univariate Cox-Regressionsanalysen eine signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit EpCAM-positiven Tumoren (Färbescore 1-12) ($p=0,047$; 95% Konfidenzintervall 0,596 - 0,998, HR 0,772), während das progressionsfreie Überleben zwar auch eine Tendenz zur Verlängerung bei EpCAM-positiven Tumoren zeigte, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,065$; 95% Konfidenzintervall 0,414 - 1,037, HR 0,655).

Ebenfalls zeigte sich eine schwache, statistisch nicht signifikante Tendenz zur längeren Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit Tumoren mit EpCAM-Überexpression (Färbescore 6-12) ($p=0,161$; 95% Konfidenzintervall 0,580 - 1,102, HR 0,799).

Das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Tumoren mit EpCAM-Überexpression (Färbescore 6-12) war signifikant verlängert ($p=0,011$; 95% Konfidenzintervall 0,222 - 0,886, HR 0,444)(Tabelle 3.4).

Dieses Ergebnis wurde mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse bestätigt ($p=0,009$; 95% Konfidenzintervall 0,075 - 0,688; HR 0,227).

Tabelle 3.4: Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit sowie des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit EpCAM-Expression und -Überexpression.

	Signifikanzniveau	95% Konfidenzintervall	Hazard Ratio
Gesamtüberlebenszeit EpCAM-Expression	$p=0,047$	0,596 - 0,998	0,772
Progressionsfreies Überleben EpCAM-Expression	$p=0,065$	0,414 - 1,037	0,655
Gesamtüberlebenszeit EpCAM-Überexpression	$p=0,161$	0,580 - 1,102	0,799
Progressionsfreies Überleben EpCAM-Überexpression	$p=0,011$	0,222 - 0,886	0,444

Hinsichtlich der einzelnen Tumorentitäten zeigten sich geringgradig verlängerte (nicht signifikant) Gesamtüberlebenszeiten bei EpCAM-positiven Tumoren (Färbescore 1-12) oder Tumoren mit EpCAM-Überexpression (Färbescore 6-12)(Tabelle 3.5 - 3.6).

Tabelle 3.5: Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei EpCAM-Expression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.

NZK-Entität	Signifikanzniveau	95% Konfidenzintervall	Hazard Ratio
klarzelliges NZK	p=0,557	0,680 - 1,231	0,915
papilläres NZK	p=0,112	0,224 - 1,187	0,516
chromophobes NZK	p=0,098	0,120 - 1,239	0,385

Tabelle 3.6: Kaplan-Meier Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei EpCAM-Überexpression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.

NZK-Entität	Signifikanzniveau	95% Konfidenzintervall	Hazard Ratio
klarzelliges NZK	p=0,476	0,775 - 1,726	1,156
papilläres NZK	p=0,110	0,248 - 1,166	0,538
chromophobes NZK	p=0,101	0,113 - 1,264	0,378

In univariaten Analysen konnte ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit EpCAM-exprimierenden chromophoben Nierenzellkarzinomen (Abbildung 3.5) sowie bei papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen mit EpCAM-Überexpression (Tabelle 3.7 - 3.8) nachgewiesen werden.

Eine Bestätigung mittels multivariater Regressionsanalysen war aufgrund der niedrigen Fallzahlen chromophober und papillärer Nierenzellkarzinome nicht möglich.

Tabelle 3.7: Kaplan-Meier Analyse des progressionsfreien Überlebens bei EpCAM-Expression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.

NZK-Entität	Signifikanzniveau	95% Konfidenzintervall	Hazard Ratio
klarzelliges NZK	p=0,872	0,553 - 1,654	0,956
papilläres NZK	p=0,367	0,132 - 2,142	0,533
chromophobes NZK	p=0,010	0,028 - 0,773	0,148

Tabelle 3.8: Kaplan-Meier Analyse des progressionsfreien Überlebens bei EpCAM-Überexpression in den Hauptentitäten von Nierenzellkarzinomen.

NZK-Entität	Signifikanzniveau	95% Konfidenzintervall	Hazard Ratio
klarzelliges NZK	p=0,691	0,456 - 2,462	1,059
papilläres NZK	p=0,025	0,042 - 0,966	0,200
chromophobes NZK	p=0,043	0,0 - 12,326	0,025

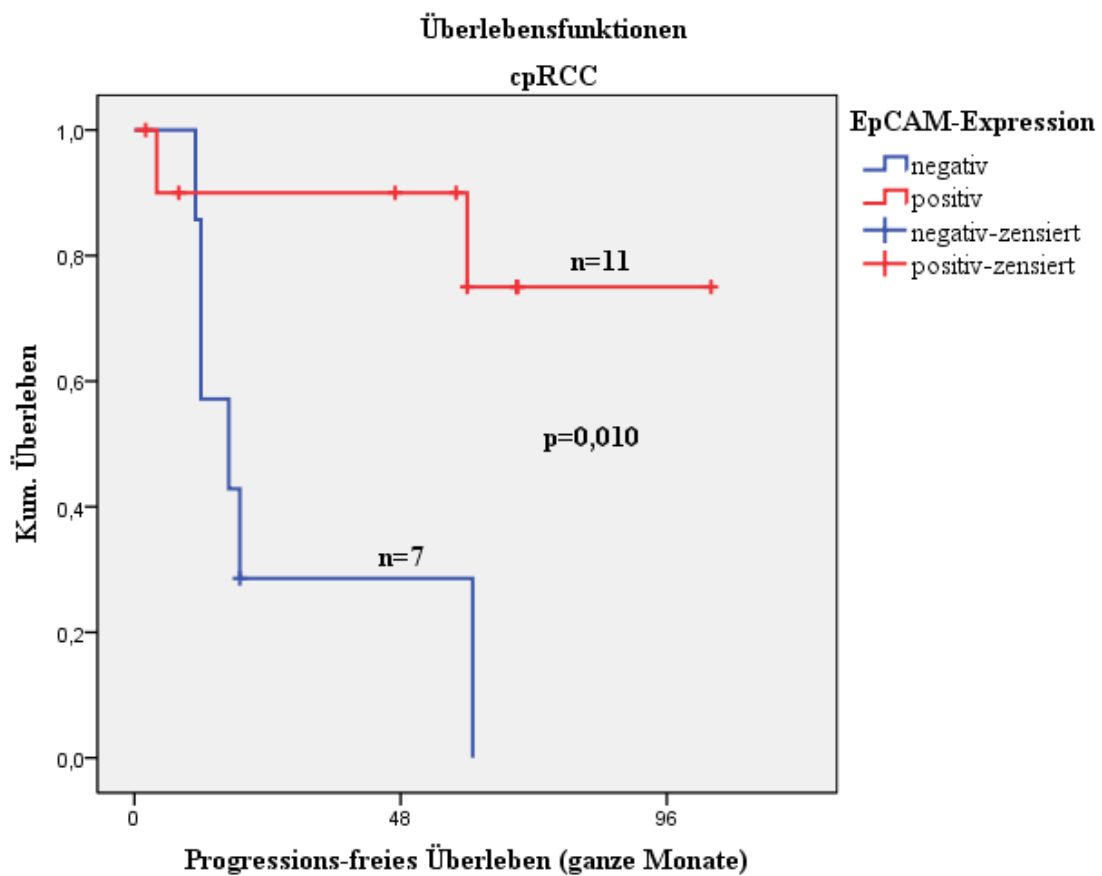


Abbildung 3.5: Signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben von Patienten mit EpCAM-exprimierenden chromophoben NZK

3.2.3 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression und dem Differenzierungsgrad der Nierenzellkarzinome

Sowohl in der Kaplan-Meier Analyse als auch mittels univariater und multivariater Cox-Regressionsanalyse zeigte sich bei Patienten mit niedriggradig differenzierten Nierenzellkar-

zinomen (Fuhrman-Grad 3 und 4) ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben EpCAM-überexprimierender Tumoren (Färbescore 6-12) im Vergleich zu EpCAM-exprimierenden (Färbescore 1-4) und EpCAM-negativen Tumoren (univariat: $p=0,003$; 95% Konfidenzintervall 0,121 - 0,650, HR 0,280 / multivariat: $p=0,011$; 95% Konfidenzintervall 0,139 - 0,770, HR 0,327)(Abbildung 3.6).

Bei hoch- und mäßiggradig differenzierten Nierenzellkarzinomen zeigte sich hingegen kein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei EpCAM-exprimierenden- oder überexprimierenden Tumoren.

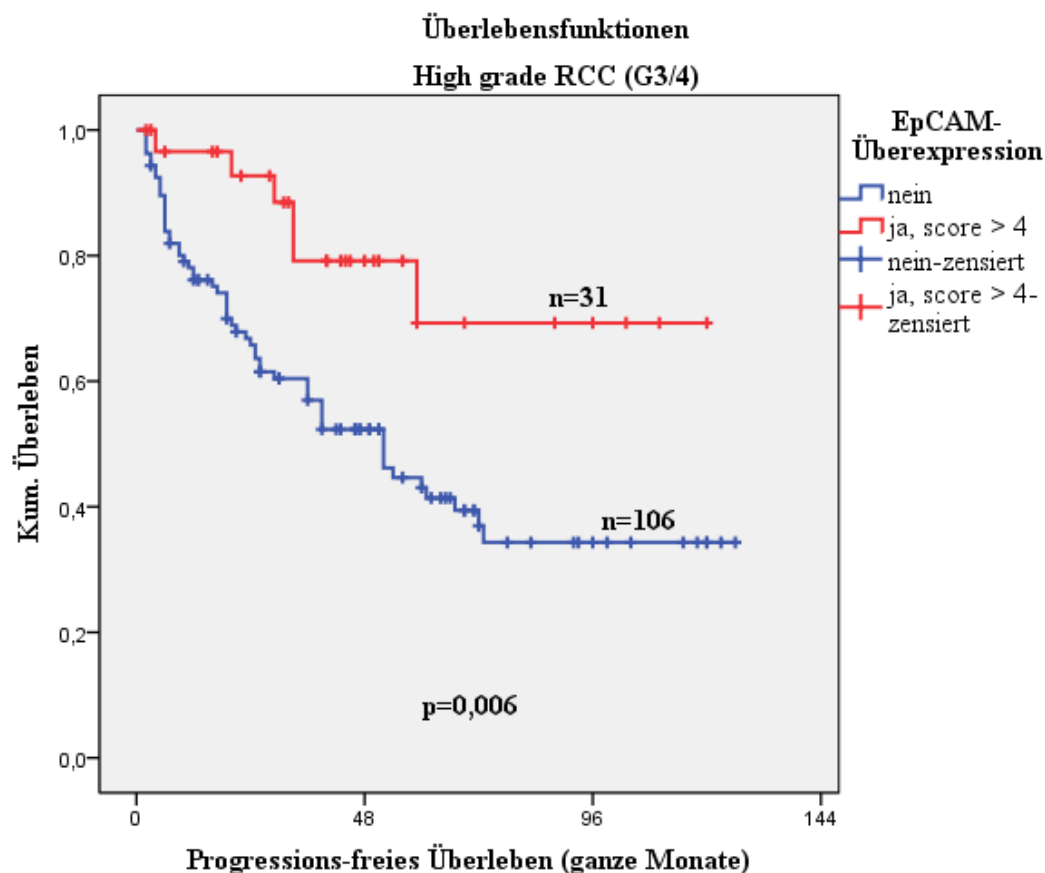


Abbildung 3.6: Progressionsfreies Überleben von Patienten mit EpCAM-überexprimierenden high-grade NZK

3.2.4 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit klinischer Parameter

Kaplan-Meier Analysen hinsichtlich klinischer Parameter wie Geschlecht und Alter in Bezug zur EpCAM-Expression der Tumoren zeigten allenfalls Tendenzen zur verlängerten progressionsfreien - und Gesamtüberlebenszeit, aber keine signifikanten Korrelationen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 948 Tumoren der Niere untersucht, 425 aus dem Institut für Pathologie an der Charite Berlin, welche bereits als fertiger Tissue-Micro-Array vorlagen, 523 der Fälle aus dem Institut für Pathologie der Universität Rostock. Letztgenannte Fälle wurden reevaluiert und ebenfalls auf Tissue-Micro-Arrays zusammengefasst, bevor dann alle Tumoren immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) gefärbt wurden.

Nach Erfassung der zur Verfügung stehenden postoperativen klinischen Verläufe (Tumorregister Rostock) konzentrierten wir uns auf folgende Untersuchungsschwerpunkte:

- Allgemeine EpCAM-Expression von Nierengewebe und Nierentumoren.
- EPCAM-Expression der unterschiedlichen Entitäten der Nierentumoren.
- EpCAM-Expression von Nierentumoren in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.
- Progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten in Abhängigkeit der EpCAM-Expression des jeweiligen Tumors.
- Gesamtüberlebenszeit der Patienten in Abhängigkeit der EpCAM-Expression des jeweiligen Tumors.

Die TMA-Technik erwies sich hierbei als praktische Methode, da sie es uns ermöglichte, viele Tumoren gleichzeitig auf einem Objektträger mit einer spezifischen Färbung zu untersuchen, auszuwerten und miteinander zu vergleichen. Dadurch konnten alle 948 Tumoren auf insgesamt 28 Arrays zeitlich effektiv untersucht werden. Auch die Materialeinsparungen hinsichtlich der immunhistochemischen Färbungen sollen hierbei nicht außer Acht gelassen werden, ein weiterer Vorteil diese Arbeitsmethode.

Bei kritischer Betrachtung der Arbeitsmethode ergibt sich allerdings die Frage, ob die winzigen Tumoranteile, die in den Arraystanzen erfasst werden können, immer ein für den Gesamtumor repräsentatives Material darstellen können. Eine sorgfältig Auswahl und Kennzeichnung der zu stanzenden Tumoreareale ist notwendig, damit das in den Stanzen erfasste Material mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit dem überwiegenden Differenzierungsgrad des Tumors entspricht und demzufolge auch die EpCAM-Expression der erfassten Tumorzellen repräsentativ für die EpCAM-Expression aller Tumorzellen ist.

Auch lässt es sich bei dieser Methode nicht immer verhindern, dass unbrauchbares Tumorgewebe gestanzt wird (z.B. Einblutungen oder Tumornekrosen) oder überhaupt kein Tumorgewebe mit der Stanze erfasst wird.

So war auch in unserer Arbeit in 21 der 948 gestanzten Fällen aus den oben genannten Gründen nicht ausreichend repräsentatives Tumormaterial in den Stanzen vorhanden.

4.1 Funktion von EpCAM

EpCAM ist ein epithelspezifisches Zelladhäsionsmolekül, welches calciumunabhängig homophile interzelluläre Bindungen vermittelt. Dies wurde in tierexperimentellen Studien mit Mäusen aufgezeigt, in denen sich sogenannte L-Cells (Mäusefibroblasten, die unfähig zur interzellulären Adhäsion sind) bei EGP40-Expression (EpCAM) auf der Oberfläche zu Zellaggregaten verbanden. Die EpCAM-Konzentrationen waren hier im Bereich der Zell-Zell-Grenzen am höchsten [41] [10]. Dabei ist die cytoplasmatische Domäne von EpCAM für die Adhäsion notwendig, da mutierte EpCAM-Proteine, denen dieser Anteil fehlte, keine interzellulären Adhäsionen mehr vermittelten [10].

EpCAM ist unabdingbar für dauerhafte Zelladhäsionen, ähnlich den durch Zelladhäsionsmoleküle wie den Cadherinen, dem Carcinoembryonalen Antigen (CEA) oder ICAM-1 vermittelten Zell-Zell-Interaktionen [10].

Die genauen Mechanismen dieser Funktion sind noch nicht ausreichend geklärt und weiterhin Bestandteil des wissenschaftlichen Interesses [16].

Desweiteren interagiert EpCAM mit seiner cytoplasmatischen Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett und spielt eine Rolle in der Regulation cadherinvermittelter interzellulärer Verbindungen [10].

Da EpCAM in malignen Tumoren vermehrt oder de novo exprimiert wird, lag die Annahme nahe, dass dieses Protein an der Entstehung von Karzinomen durch direkte Auswirkungen auf den Zellzyklus beteiligt ist. Muenz et al. [47] zeigten 2004, dass EpCAM zum einen über die Induktion der zellzyklusregulierenden Gene Cyclin A und Cyclin B direkte Auswirkung auf den Zellzyklus sowie auf Proliferation und Metabolismus epithelialer Zellen und Fibroblasten hat, zum anderen die Fähigkeiten besitzt, das Protoonkogen c-myc zu induzieren. Damit konnte belegt werden, dass EpCAM direkt in die Mechanismen der Tumorentstehung involviert ist. Das wurde zusätzlich dadurch verdeutlicht, dass eine Hemmung von EpCAM eine deutliche Reduktion der Proliferation von Karzinomzellen bewirkte. Das erklärt auch die in Kapitel 1.1.5. erwähnte deutlich erhöhte Expression von EpCAM in malignen Neoplasien und Präneoplasien.

Auch im Verlauf der Entwicklung der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse spielt EpCAM eine entscheidende Rolle. Cirulli et al. [18] 1998, konnten nachweisen, dass es durch Lösung EpCAM-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen in fetalen Pankreaszellen zu einem signifikanten Anstieg der Transkription der Insulin- und Glucagongene kommt, was die Annahme stützt, dass die Inaktivierung oder Lösung von EpCAM von Zelloberflächen ein Signal für die Differenzierung von Langerhans-Zellen darstellt.

4.2 EpCAM-Expression der Nieren

In der Niere exprimieren besonders die Epithelien des Tubulusapparates (mit ansteigender EpCAM-Expression von proximal nach distal [57] [10]) sowie der Sammelrohre EpCAM. Die Epithelzellen der Henle'schen Schleife sowie der Bowman'schen Kapsel exprimieren geringere Mengen EpCAM.

Die Kapillarschlingen der Nierenglomeruli sind negativ (Abbildung 4.1 und 4.2).

Das Urothel des Nierenbeckens und der ableitenden Harnwege zeigt jeweils nur eine geringfügige Positivität [45] [10] [59].

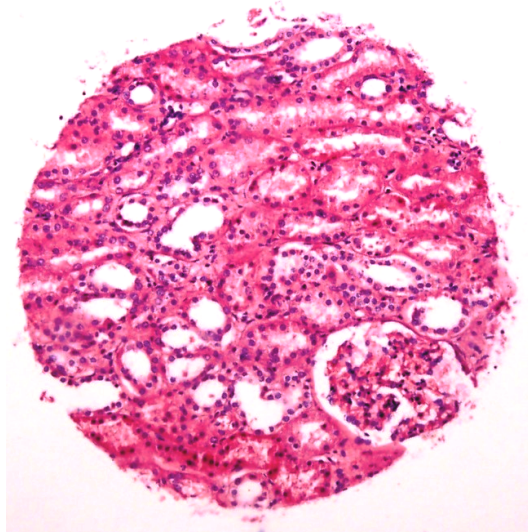


Abbildung 4.1: Stanze (HE) mit tumorfreiem Normalgewebe aus der Niere

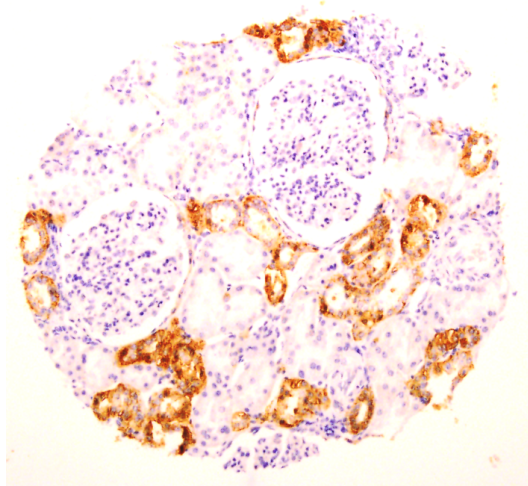


Abbildung 4.2: Stanze (EpCAM) mit tumorfreiem Normalgewebe aus der Niere

Kommentar zur Abbildung 4.1 - 4.2: Die Abbildungen zeigen jeweils eine Stanze mit tumorfreiem Nierenrindengewebe. Die erste Stanze ist HE-gefärbt, die zweite Stanze zeigt die dazugehörige EpCAM-Immunhistochemie. Sehr gut ist hier die oben erwähnte EpCAM-Expression im tumorfreien Nierengewebe zu sehen, mit einer deutlichen Färbung im Bereich der distalen Tubuli und der Sammelrohre, allenfalls geringer Färbung im Bereich der proximalen Tubuli und fehlender Färbung der Glomeruli mit den Kapillarschlingen.

4.3 EpCAM-Expression in Nierentumoren

Zwei Arbeiten, welche sich mit der Expression von EpCAM in den unterschiedlichen Entitäten der Nierentumoren beschäftigt haben, sind von Went, P. et al. 2005 [57] und von Eichelberg et al. 2013 [23]

Went et al. [57] untersuchten 182 Tumoren der Niere hinsichtlich ihrer EpCAM-Expression auf Tissue-Micro-Arrays. Bei den Tumoren handelte es sich um 147 klarzellige, 20 papilläre und 12 chromophobe Nierenzellkarzinome sowie 3 Onkozytome. Desweiteren wurden in dieser Studie 21 chromophobe Karzinome und 15 Onkozytome auf Großflächenschnitten untersucht.

Eichelberg et al.[23] untersuchten insgesamt 1088 Tumoren der Niere mittels Tissue-Micro-Array-Technik. Hierbei waren 657 klarzellige NZK, 131 papillären NZK, 56 chromophobe NZK und 48 Onkozytome für eine immunhistochemische Auswertung der EpCAM-Expression geeignet.

Genau wie in unserer Arbeit wurde auch in diesen Studien ausschließlich eine membranöse Anfärbbarkeit als positiv gewertet und die Graduierung wurde aus der Färbeintensität sowie der prozentualen Anzahl der gefärbten Zellen berechnet.

Bei Went et al. [57] zeigten 8% der klarzelligen NZK eine starke EpCAM-Expression, 9% eine moderate und 12% eine schwache Expression. 71% der klarzelligen Karzinome waren negativ. Bei Eichelberg et al.[23] zeigten 36% der klarzelligen NZK eine starke EpCAM-Expression, 15% eine moderate und 16% eine schwache Expression. 34% der klarzelligen Karzinome waren negativ.

Tabelle 4.1: EpCAM-Expression klarzelliger Nierenzellkarzinome - ein Literaturvergleich

Autor/Artikel + Anzahl klarzelliger NZK	starke Expression (%)	moderate Expression (%)	schwache Expression (%)	EpCAM- Negativität (%)
Went et al. [57] (n=147)	8	9	12	71
Eichelberg et al.[23] (n=767)	36	15	16	34
Eigene Arbeit (n= 642)	4,4	9,5	22,4	63,7

Hinsichtlich der EpCAM-Expression der klarzelligen Nierenzellkarzinome im Allgemeinen sowie der Intensitäten der EpCAM-Expression zeigen sich in unserer Arbeit ähnliche Werte, verglichen mit der Arbeit von Went et al. [57].

Bei Eichelberg et al.[23] war der Anteil der klarzelligen NZK mit EpCAM-Expression im Allgemeinen und mit starker Färbeintensität im Speziellen deutlich höher als in den beiden anderen Arbeiten. Mögliche Erklärungen hierfür können bei Verwendung des gleichen Antikörpers bei Went [57] und Eichelberg [23] (jeweils Clone VU-1D9, Novocastra), die unterschiedlichen Arbeitsschritte und die Verwendung unterschiedlicher Substrate zur Entparaffinierung, Rehydrierung, Demaskierung und Färbung sein. Und trotz des deutlich geringeren Anteils der negativen klarzelligen NKZ bei Eichelberg im Vergleich zu Went oder unserer Arbeit, zeigt sich auch hier, dass die klarzelligen Karzinome signifikant häufiger kein EpCAM exprimieren als die anderen Nierentumorentitäten.

Hinsichtlich der anderen Entitäten zeigten sich bei Went et al. [57], dass 90% der 20 papillären NZK EpCAM exprimierten, wovon 35% eine starke, 20% eine moderate und 35% eine schwache Expression von EpCAM aufwiesen. Es gab keine Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmuster zwischen papillären Karzinomen Typ I und Typ II. Bei den 12 chromophoben Karzinomen exprimierten 78% EpCAM, davon 62% stark, je 8% moderat bzw. schwach.

Bei Eichelberg et al.[23] sahen die Ergebnisse ähnlich aus: 89% der 131 papillären NZK exprimierten EpCAM und 79% wiesen hierbei eine hohe Färbeintensität auf. 93% der 56 chromophoben Karzinome waren in dieser Arbeit positiv, 89% mit starker Färbeintensität.

Hinsichtlich der Antigenexpression im Allgemeinen ergaben sich auch in unserer Arbeit wieder ähnliche Zahlen, papilläre NZK waren in 81,3% positiv, chromophobe NZK in 79,4% positiv, allerdings waren bei uns die prozentualen Anteile der Tumoren mit starker Expression deutlich geringer (papilläre NZK: 29,0%; chromophobe NZK: 33,8%). Dies kann möglicherweise auf den unterschiedlichen Antikörper, den wir im Vergleich zu den anderen beiden Studien verwendet haben, aber auch auf unterschiedliche Arbeitsschritte und Reagenzien während der Entparaffinierung, Rehydrierung, Demaskierung und Färbung zurückgeführt werden. Und sicherlich spielen hierbei auch subjektive Faktoren hinsichtlich der Einschätzung von Färbeintensitäten und Verteilungen sowie die bei diesen Entitäten recht geringen Fallzahlen eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

Desweiteren muss erwähnt werden, dass wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der EpCAM-Expression zwischen den beiden Subtypen des papillären Nierenzellkarzinoms gefunden haben. Hier korrespondiert unser Ergebnis mit den Ergebnissen von Went et al., während Eichelberg et al. diese Unterteilung nicht vornahmen.

Eine weitere Arbeit zeigte dann doch Unterschiede in den Expressionsmustern dieser beiden Tumorsubentitäten auf. Seligson et al.[53] untersuchten 2004 unter anderem 42 papilläre NZK hinsichtlich ihrer EpCAM-Expression, wobei der eosinophile Subtyp deutlich stärkere Färbeintensitäten aufwies als der basophile Subtyp.

Die drei Onkozytome, die Went et al. auf einem Array untersuchten, waren allesamt negativ, bei den 48 Onkozytomen, die Eichelberg et al. untersuchten, exprimierten 70% EpCAM, davon wiesen 35% starke, 25% moderate und 10% schwache Färbeintensitäten auf. Verglichen mit unseren Werten, zeigen sich auch bei den Onkozytomen bei Eichelberg et al. häufigere und intensivere immunhistochemische Reaktionen, wobei auch bei dieser Entität die Fallzahlen ziemlich gering sind.

Die Untersuchung von Went et al. hinsichtlich der EpCAM-Expression von chromophoben Karzinomen und Onkozytomen auf Großflächenschnitten zeigte in 90% der 21 chromophoben NZK eine starke Expression in $> 90\%$ der Zellen. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der Array-Untersuchungen von Went und Eichelberg. In unserer Arbeit wiesen nur 33,8% eine starke Expression auf.

Ein Karzinom auf dem Großflächenschnitt von Went zeigte eine fokale Positivität und nur ein Karzinom war komplett negativ.

Bei den Onkozytomen zeigten zwar 87% der 15 Onkozytome eine EpCAM-Expression, allerdings meist nur partiell in wenigen, teils diffus verteilten Zellen, sodass insgesamt weniger als 10 % aller Tumorzellen positiv waren.

In unserer Untersuchung waren mit 28/45 (62,2%) die Mehrzahl der Onkozytome negativ für EpCAM, auf den Großflächenschnitten bei Went, P. et al. waren 87% positiv, allerdings meist nur in kleinen Arealen oder nur partiell in Einzelzellen. Nicht auszuschließen bleibt hierbei, dass wenn Onkozytome nur inhomogene Färbemuster in einzelnen Arealen aufweisen, diese Areale auf Arraystanzen nicht erfasst sein könnten. Diese Hypothese korrespondiert auch mit den Ergebnissen von Went et al. selbst, deren drei separat auf einem Array untersuchte Onkozytome allesamt negativ waren.

Desweiteren zeigten Went et al., dass die meisten Tumoren, unabhängig davon welcher histologischen Entität sie zuzuordnen waren, eine inhomogene Färbung zeigten und dass sarkomatoid entdifferenzierte Areale, ebenfalls unabhängig von der primären Entität, ausnahmslos negativ waren.

Eine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad, Stadium bei Diagnosestellung und EpCAM-Expression konnte bei Went et al. nicht belegt werden.

In unserer Arbeit zeigte sich ein zwar geringer aber stetiger Anstieg der EpCAM-Expressionen von hochdifferenzierten Tumoren (G1) hin zu niedriger differenzierten Tumoren (G3) mit deutlichen Abfall bei weiterer Entdifferenzierung (Fuhrman Grad 4). Im Gegensatz hierzu waren bei Eichelberg et al. die schlechter differenzierten (Fuhrman-Grad 3 + 4) klarzelligen NZK häufiger EpCAM-negativ.

Die bereits erwähnte Studie von Seligson et al. [53] zeigte vergleichbare Ergebnisse. Von 404 Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen zeigten sich auch hier die stärksten Expressionen in chromophoben Karzinomen, etwas weniger in papillären Karzinomen. Klarzellige Karzinome sowie sarkomatoide Anteile zeigten die schwächsten Expressionsmuster. Die un-

tersuchten Onkozytome zeigten Anfärbbarkeiten einzelner, diffus verteilter Zellen.

Desweiteren beinhaltete diese Studie 4 Sammelrohrkarzinome, welche allesamt starke EpCAM-Expressionen zeigten.

Während wir in unserer Arbeit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der EpCAM-Expression nodal-positiver Tumoren oder Tumoren mit Fernmetastasen nachweisen konnten, zeigten Went et al. dass Metastasen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikant häufiger EpCAM-negativ waren als die zugehörigen primären klarzelligen NZK ($p=0,0075$), Eichelberg et al. zeigten, dass klarzellige NZK mit Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger EpCAM-negativ waren als klarzellige NZK ohne Lymphknotenmetastasen ($p=0,018$).

Es stellt sich nun die Frage, ob sich diese Erkenntnisse über die Expressionsmuster von EpCAM in normalen Geweben bzw. Tumorgewebe und dem verlängerten progressionsfreien Überleben (seltener Metastasierung) nicht widerspricht?

Zum einen wird EpCAM in neoplastischen Geweben und präkanzerösen Vorstufen deutlich vermehrt exprimiert als in den korrespondierenden tumorfreien Geweben und diese Expression steigt bis zu einem gewissen Punkt mit abnehmender Differenzierung weiter an, zum anderen zeigen Patienten mit EpCAM-exprimierenden Tumoren ein verlängertes progressionsfreies Überleben.

Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich gut mit den oben erwähnten Funktionen von EpCAM erklären. Zum einen hat EpCAM durch Induktion des Protoonkogens c-myc direkte Auswirkungen auf den Zellzyklus und daraus resultierend auch auf die Tumorentstehung, wodurch sich die vermehrte Expression in neoplastischen Geweben und präkanzerösen Vorstufen erklären lässt. Zum anderen ist es aber auch ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, welches Zell-/ Tumorzellverbände festigt und das Herauslösen einzelner Tumorzellen erschwert. Die geringere Metastasierung EpCAM-exprimierender Tumoren kann so erklärt werden.

4.4 Überlebenszeitanalysen

In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten zu dem Thema Überlebenszeit EpCAM-exprimierender Nierenzellkarzinome, wobei sich viele Autoren allerdings auf die Analyse der klarzelligen Nierenzellkarzinome beschränkten.

Went et al.[57] untersuchten die Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Mittels Multivariater Cox-Regressionsanalyse (Variablen: Tumor-Stage, Tumor-Grading, EpCAM-Expression und Vorhandensein von Tumornekrosen) von 147 Tumoren wurde zum einen erwartungsgemäß aufgezeigt, dass ein niedriger Differenzierungsgrad, das Vorhandensein von Nekrosen und eine fortgeschrittene Ausdehnung des Primärtumors (pT-Stage) mit einer signifikant schlechteren Prognose und verkürzter Gesamtüberlebenszeit assoziiert sind. Zum anderen konnte eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit

EpCAM-exprimierenden klarzelligen NZK aufgezeigt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,2$) (Tabelle 4.2). Zum progressionsfreien Überleben von Patienten mit EpCAM-exprimierenden Tumoren machen Went et al. keine Aussagen.

Kim et al.[37] und Klatte et al. [38] untersuchten ausschließlich klarzellige Nierenzellkarzinome. Kim et al. wiesen mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse von 318 klarzelligen NZK eine nicht signifikante Tendenz ($p=0,49$) zur verlängerten Gesamtüberlebenszeit bei EpCAM-exprimierenden Tumoren nach (Tabelle 4.2). Klatte et al. zeigten ein verlängertes progressionsfreies Überleben EpCAM-exprimierender klarzelliger Nierenzellkarzinome mittels univariater Cox-Regressionsanalyse von 170 Tumoren, ohne statistische Signifikanz ($p=0,173$) zu erreichen (Tabelle 4.2).

Diese Ergebnisse der Arbeiten von Went, Kim und Klatte decken sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit, auch wir haben verlängerte Gesamtüberlebenszeiten und verlängerte progressionsfreie Überlebenszeiten bei Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen nachgewiesen, ebenfalls ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Eichelberg et al. [23] und Seligson et al.[53] wiesen jeweils signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeiten bei Patienten mit EpCAM-exprimierenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen nach (Tabelle 4.2).

Eichelberg et al. untersuchten hierfür sowohl mittels univariater als auch multivariater Regressionsanalysen 657 klarzellige Nierenzellkarzinome hinsichtlich des Überlebens der Patienten in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression der einzelnen Tumoren.

Seligson et al. untersuchten 318 klarzellige Nierenzellkarzinome.

Sowohl Went et al. als auch Eichelberg et al. untersuchten in ihren Arbeiten jeweils die EpCAM-Expression in allen Hauptentitäten von Nierentumoren. Hinsichtlich der Auswertung der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression beschränkten sie sich allerdings ebenfalls auf die klarzelligen Karzinome bzw. das Gesamtkollektiv. Demzufolge gibt es für unsere Ergebnisse der Überlebenszeiten der chromophoben und papillären Nierenzellkarzinome keine Vergleichsdaten.

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, haben wir in univariaten Analysen ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit EpCAM-exprimierenden chromophoben Nierenzellkarzinomen sowie EpCAM-überexprimierenden chromophoben und papillären Nierenzellkarzinomen aufzeigen können. Eine bestätigende Darstellung unserer Ergebnisse mittels multivariater Analyse war jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen chromophober und papillärer Karzinome nicht möglich. Studien mit größeren Fallzahlen dieser Tumoren sind hierfür notwendig.

Alle anderen Untersuchungen klarzelliger, chromophober und papillärer NZK hinsichtlich Gesamtüberlebenszeiten und progressionsfreien Überlebenszeiten bei EpCAM-Expression bzw. -Überexpression zeigten jeweils Tendenzen zur Verlängerung ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Tabelle 4.2: Überlebenszeitanalysen EpCAM-exprimierender NZK - ein Literaturvergleich.

Autor/Artikel	Fallzahl/Entität	Ergebnisse
Seligson et al.[53]	318 klarzellige NZK	41% EpCAM-positive klarzellige NZK Signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei EpCAM-positiven Tumoren (p=0,017)
Eichelberg et al.[23]	657 klarzellige NZK	66% EpCAM-positive klarzellige NZK Signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei EpCAM-positiven Tumoren (p=0,001)
Kim et al.[37]	318 klarzellige NZK	Keine Angaben zur EpCAM-Expressionshäufigkeit Verlängertes Gesamtüberleben bei EpCAM-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz (p=0,49)
Klatte et al. [38]	170 klarzellige NZK	Keine Angaben zur EpCAM-Expressionshäufigkeit Verlängertes progressionsfreies Überleben bei EpCAM-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz (p=0,173)
Went et al.[57]	147 klarzellige NZK	28,6% EpCAM-positive klarzellige NZK Verlängertes Gesamtüberleben bei EpCAM-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz (p=0,2)

Tabelle 4.3: Fortsetzung Tabelle 4.2

Autor/Artikel	Fallzahl/Entität	Ergebnisse
Eigene Untersuchungen	642 klarzellige NZK	Signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit EpCAM-positiven Tumoren ($p=0,047$)
	155 papilläre NZK	Signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit EpCAM-überexprimierenden Tumoren ($p= 0,011$)
	69 chromophobe NZK	Signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit EpCAM-exprimierenden chromophoben Karzinomen ($p= 0,01$)
	45 Onkozytome	oder EpCAM-überexprimierenden chromophoben ($p=0,043$) und papillären ($p=0,025$) NZK

4.5 Diagnostische Relevanz von EpCAM

Auch in der täglichen pathologischen Routinediagnostik erweist sich EpCAM als nützlicher Marker.

Als rein epitheliales Antigen kann man bei Tumoren unbekannten Ursprungs bei positiver immunhistochemischer Färbereaktion die epitheliale Herkunft belegen. Auch bei der Unterscheidung zwischen einem nichtepithelialen Primärtumor und Metastasen eines andersorts gelegenen epithelialen Tumors kann EpCAM hilfreich sein. Als Beispiel sollen hier neuropathologische Untersuchungen von Tumoren des Gehirns genannt werden, wo mittels eines epithelialen Markers wie EpCAM unterschieden werden kann, ob ein Hirntumor primär vom Hirnparenchym ausgeht (EpCAM-Negativität) oder ob es sich um Metastasen epithelialer Tumoren wie z.B. einem Bronchial- oder Mammakarzinom (EpCAM-Positivität) handelt.

Auch in der Differenzialdiagnostik der einzelnen Nierentumorentitäten kann EpCAM hilfreich sein. Wenn man beispielsweise einen hellzellig differenzierten Tumor der Niere untersucht, kann die Unterscheidung zwischen einem klarzelligem Nierenzellkarzinom und beispiels-

weise einem chromophoben Nierenzellkarzinom mit hellzelliger Differenzierung schwierig sein. Aufgrund der deutlich höheren Expression von EpCAM in chromophoben Karzinomen kann eine immunhistochemische Untersuchung mit diesem Marker hier wegweisend sein.

Eine der wohl wichtigsten diagnostischen Möglichkeiten, die uns EpCAM bietet, ist die schwierige Differentialdiagnose zwischen einem chromophoben Nierenzellkarzinom und einem Onkozytom. Diese Differentialdiagnose ist von großer Bedeutung für den Patienten, da es hierbei auch um die Unterscheidung eines gutartigen von einem bösartigen Tumor geht. Wie wir in unserer Arbeit aufzeigen konnten, haben diese beiden Tumorentitäten aber unterschiedliche Expressionsmuster hinsichtlich EpCAM. 79,4% aller chromophoben Karzinome waren positiv, weit mehr als die Hälfte hiervon mit moderater oder starker Expression, während nur 37,8% der Onkozytome eine in den meisten Fällen dann auch nur schwache Expression von EpCAM aufwiesen. Dadurch kann die immunhistochemische Untersuchung mit EpCAM bei der schwierigen Unterscheidung dieser beiden Tumoren hilfreich sein.

4.6 Das Antigen EpCAM als Ziel immuntherapeutischer Interventionen

Nachdem nun gezeigt wurde, dass das Membranprotein EpCAM durchaus eine prognostische Bedeutung bei einigen Nierentumoren hat und auch in der täglichen Diagnostik hilfreich sein kann, bleibt abschließend die Frage zu klären, ob denn mit entsprechenden immuntherapeutischen Interventionen mit Anti-EpCAM-Antikörpern ein therapeutischer Nutzen erzielt werden kann.

Bereits 1986 erkannten Göttlinger et al. [30], dass EpCAM ein bedeutender Zielpunkt für eine antikörpervermittelte Tumorthherapie sein kann.

Einer der ersten Antikörper gegen EpCAM war Edrecolomab, ein monospezifischer Anti-EpCAM-Antikörper. Über Bindung an EpCAM wird eine endogene Signalkaskade aktiviert mit dem Zielpunkt der Zerstörung der betroffenen Zelle. Zwar ließ sich mit dieser alleinigen antikörperbasierten Therapie eine Zytotoxizität gegenüber EpCAM-exprimierenden Zellen nachweisen, allerdings konnte kein größerer Effekt als mit den bis dahin eingesetzten adjuvanten Chemotherapeutika erreicht werden. [50] [52] [9] [25]. Es mussten andere Wege gefunden werden um diesen monospezifischen Antikörper und dessen Wirkung zu verbessern.

Im Jahr 2000 zeigten Flieger et al. [26] in vitro an EpCAM-positiven Kolonkarzinomzellen (Zelllinie HT29), dass ein gegen EpCAM und gegen CD3 gerichteter doppelspezifischer Antikörper die Zytotoxizität von CD-3-exprimierenden zytokin-induzierten Killerzellen (CIK) gegenüber EpCAM-exprimierenden Tumorzellen deutlich erhöhen kann. Dazu wurden die Killerzellen (CIK) in vitro aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes unter Zugabe von Interferon- γ , Interleukin-2, Interleukin-1 und einem monoklonalen CD3-Antikörper generiert und deren Zytotoxizität allein mit der Zytotoxizität unter Zugabe des doppelspezi-

fischen EpCAM/CD3-Antikörpers (dsAK) verglichen. Die generierten Killerzellen (CIK) wiesen an sich schon eine deutlich höhere Zytotoxizität auf als nicht modifizierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Unter Zugabe des doppelspezifischen Antikörpers kam es zur Verbindung der CD3-positiven Killerzellen (CIK) mit den EpCAM-exprimierenden Tumorzellen und eine nochmals deutlich gesteigerte Zytotoxizität konnte belegt werden. Unter nochmaliger Zugabe von IFN- α und IL-2 zum CIK-AK-Komplex konnte die Toxizität gegenüber den Tumorzellen weiterhin gesteigert werden.

Die hier aufgezeigte Zytotoxizität war deutlich höher als die Toxizität monospezifischer Anti-EpCAM-Antikörper gegen Tumorzellen.

Desweiteren kombinierten Flieger et al. den doppelspezifischen Antikörper mit anderen monospezifischen Anti-EpCAM-Antikörpern, welche an anderen Domänen des Adhäsionsmoleküls angreifen, um zu schauen, ob eine weitere Erhöhung der Toxizität gegenüber den Tumorzellen erreicht werden kann. Es zeigte sich eher ein gegenteiliger Effekt, die Toxizität beider Antikörper zusammen war geringer als die Zytotoxizität des doppelspezifischen Antikörpers alleine.

Diese Studie zeigte eindrucksvoll auf, dass eine antikörperbasierte Therapie in Verbindung mit Immuntherapeutika (doppelspezifische Antikörper) bei Tumorzellen einen deutlich höheren zytoreduktiven Effekt haben kann als monospezifische Anti-EpCAM-Antikörper.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurden in den letzten Jahren diverse Studien hinsichtlich Antikörpern gegen EpCAM durchgeführt, mit dem Ziel, eine nochmals verbesserte Wirkung zu erzielen und vor allem auch um die klinische Wirkung und eventuelle Nebenwirkungen besser beurteilen zu können.

So wurde in den letzten Jahren als Weiterentwicklung des doppelspezifischen Antikörpers der trispezifische Antikörper Catumaxomab entwickelt und in diversen Studien auf seine Wirksamkeit getestet.

Catumaxomab hat drei Bindungsstellen: Eine für EpCAM auf Tumorzellen, eine für CD3 auf T-Zellen und eine für den Fc γ -Rezeptor auf akzessorischen Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen oder natürlichen Killerzellen [52]. Die Wirkung dieses Antikörpers basiert zum einen auf einer direkt antikörpervermittelten Zytotoxizität, zum anderen auf T-Zell-vermittelter Zytotoxizität sowie auf Phagozytose der Tumorzellen durch Aktivierung der Fc γ -Rezeptor-positiven akzessorischen Immunzellen[52] (Abbildung 4.3).

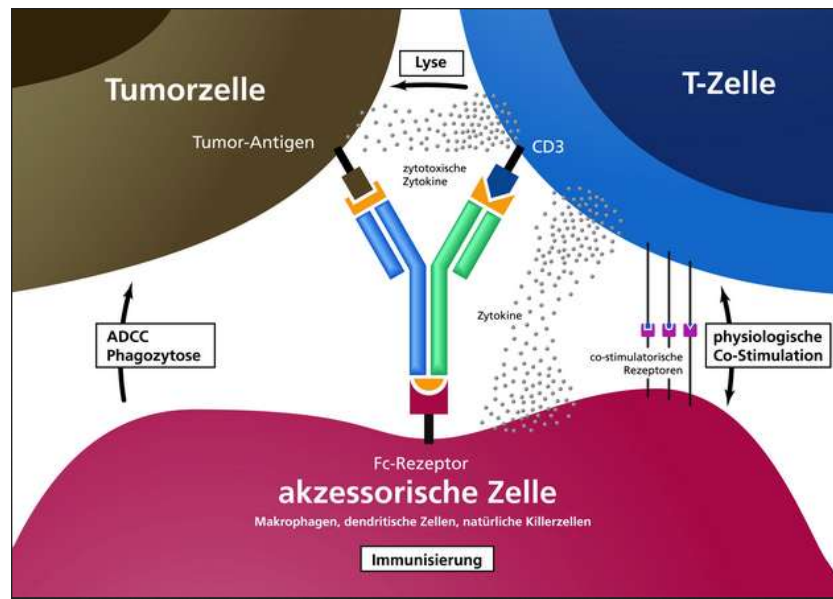


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des trispezifischen Antikörpers Catumaxumab.

Kommentar zur Abbildung 4.3: Die Abbildung zeigt schematisch den Antikörper Catumaxumab mit seinen drei Bindungsstellen für EpCAM auf Tumorzellen (links oben), für CD3 auf T-Zellen (rechts oben) und für den Fc γ -Rezeptor auf akzessorischen Immunzellen (unten).

Einige klinische Studien belegen die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Catumaxomab. 2009 legten Heiss et al [31] die Ergebnisse einer prospektiven, randomisierten Phase II/III-Studie, hinsichtlich der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Catumaxomab gegen malignen Ascites durch EpCAM-positive Karzinome vor. Es wurden 258 Karzinompatienten mit malignem Ascites untersucht, 129 hiervon mit EpCAM-positiven Ovarialkarzinomen. Die restlichen 129 Patienten waren an anderen EpCAM-positiven Karzinomen, v.a. Magen-, Mamma-, Pankreas-, Kolon- und Endometriumkarzinomen, erkrankt. Catumaxomab wurde mittels intraperitonealer Infusion verabreicht und es konnten signifikant verlängerte parazentesefreie Intervalle (hazard ratio = 0,254; $p < 0,0001$) sowie eine signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit EpCAM-positivem Magenkarzinom ($p = 0,0313$) nachgewiesen werden. Bei den übrigen Tumorentitäten zeigte sich lediglich eine Tendenz zur längeren Gesamtüberlebenszeit ohne das Niveau statistischer Signifikanz zu erreichen [31].

Eine weitere Studie richtete dann das Augenmerk auf malignen Ascites bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit sarkomatoider Differenzierung. Obwohl wir in unserer Arbeit aufgezeigt haben, dass sarkomatoid dedifferenzierte Nierenzellkarzinome eher selten EpCAM-

exprimieren, zeigten Pilanci et al. [48], dass Catumaxomab auch bei malignem Ascites durch Nierenzellkarzinome einen deutlichen Behandlungseffekt bei niedrigem Nebenwirkungsprofil aufweist. Bereits nach zweimaliger Anwendung (intraperitoneale Applikation) waren weitere Parazentese bei den Patienten nicht mehr notwendig.

Bleibt abschließend noch zu klären, inwieweit es immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung EpCAM-exprimierender Primärtumoren gibt. Herrmann et al. [32] zeigten 2010 in experimentellen Versuchen an Mäusen, dass MT110, ein EpCAM-/CD3-bispezifischer Antikörper, durch T-Zellaktivierung zur Zerstörung tumorinitiierender Zellen des kolorektalen Karzinoms führen kann und dadurch ein Tumorwachstum hemmen kann.

Gleichartige Beobachtungen machten Zhang et al. [58] 2013 bei EpCAM-positiven Stammzellen des hepatozellulären Karzinoms. Mittels T-Zellaktivierung durch bispezifische Antikörper konnten Tumorstammzellen zerstört und ein Tumorwachstum gehemmt werden.

Ähnliche Ergebnisse mit bi- bzw. trispezifischen Antikörpern zur Aktivierung von T-Zellen gegen EpCAM-exprimierende Tumor- bzw. Tumorstammzellen zeigten Cioffi et al. [17] 2012 anhand des Pankreaskarzinoms und Riesenberg et al. [49] 2001 anhand des Prostatakarzinoms.

Die Notwendigkeit einer antikörperbasierten Chemotherapie vor oder als Ersatz einer chirurgischen Intervention ist hauptsächlich bei großen Tumoren, die wegen ihrer Lage oder der Inoperabilität des betroffenen Organs nicht einfach chirurgisch entfernt werden können, gegeben. Dieses ist bei Nierenzellkarzinomen selten der Fall, die Niere ist paarig angelegt und operativ gut zugänglich, sodass bei Tumorbefall eine ganze Niere oder zumindest Anteile davon, chirurgisch reseziert werden können, ohne gleich eine lebenslange Organersatztherapie für den Patienten notwendig zu machen. Bei vorbestehender Einnierigkeit ist der Nutzen einer antikörperbasierten Chemotherapie zur Bekämpfung eines Tumors im Vergleich zur operativen Tumorthherapie deutlich größer, weil somit dem Patienten eine lebenslange Dialysebehandlung erspart werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es auch im therapeutischen Bereich enorme Fortschritte bezüglich unseres Wissens über EpCAM und vor allem betreffs einer gezielten Bekämpfung EpCAM-exprimierender Tumorzellen gibt. Und vielleicht kann eines Tages die Expression von EpCAM in Nierentumoren sowie auch in Tumoren anderer Organe als prädiktiver Marker das Ansprechen eines Medikamentes gegen die antigenträgenden Tumorzellen vorhersagen, ähnlich dem Her-2-neu-Rezeptorstatus beim Mammakarzinom oder der EGFR-Mutation beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom.

5. Zusammenfassung

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) ist ein membranständiges Glykoprotein, welches als Zelladhäsionsmolekül homophile interzelluläre Bindungen vermittelt. Es wird an der basolateralen Membran vieler epithelialer Zellen exprimiert, vor allem in Drüsenepithelien und Urothelzellen. Neoplasien epithelialer Gewebe gehen stets mit einer vermehrten EpCAM-Expression einher, so auch die Tumoren der Niere, je nach Entität in unterschiedlicher Häufigkeit und Intensität.

An insgesamt 948 Nierentumoren wurden mittels der Tissue-Micro-Array-Technik die Häufigkeiten und Intensitäten der EpCAM-Expressionen primärer Nierentumoren untersucht und mit klinischen follow-up Daten verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass 46,7 % aller Nierentumoren EpCAM exprimierten, davon papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome am häufigsten und mit höchster Intensität, während die klarzelligen Nierenzellkarzinome nur in 36 % positiv waren und hiervon die meisten Tumoren dann auch nur eine geringe Intensität aufwiesen.

Desweiteren stellten wir eine erhöhte EpCAM-Expression bei schlechter differenzierten Tumoren fest.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von EpCAM zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei Patienten mit EpCAM-exprimierenden Tumoren gegenüber EpCAM-negativen Tumoren.

Ebenfalls statistisch signifikant verlängert waren das progressionsfreie Überleben von Patienten mit EpCAM-überexprimierenden Tumoren der Niere unabhängig von der Entität sowie das progressionsfreie Überleben von Patienten mit EpCAM-exprimierenden bzw. -überexprimierenden chromophoben Karzinomen und EpCAM-überexprimierenden papillären Karzinomen.

Niedriggradig differenzierte EpCAM-überexprimierende Tumoren (Fuhrman-Grad 3 + 4) zeigten ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu EpCAM-exprimierenden oder EpCAM-negativen niedriggradig differenzierten Tumoren.

In der Diagnostik ist der Nachweis des Antigens EpCAM hilfreich, z.B. bei der Differentialdiagnose eines epithelialen von einem nichtepithelialen Tumor oder bei der Differentialdiagnose zwischen einem Onkozytom und einem chromophoben Karzinom der Niere.

Auch bei antikörperbasierenden Therapien spielt EpCAM als Zielantigen eine immer bedeutendere Rolle bei der Bekämpfung verschiedenster Tumoren. Für den klinischen Gebrauch bereits zugelassen ist Catumaxomab zur Behandlung von malignem Ascites EpCAM-positiver Tumoren.

Abschließend kann festhalten werden, dass EpCAM ein sehr interessantes Oberflächenmolekül epithelialer Zellen ist, dessen Nachweis auf Tumorzellen zum einen eine Aussage hinsichtlich der Prognose der Tumorerkrankung treffen kann, zum anderen in der pathologischen Routinediagnostik eingesetzt werden kann sowie darüber hinaus zukünftig vielleicht auch als prädiktiver Marker das Ansprechen therapeutischer Interventionen vorhersagen kann.

6. Thesen zur Dissertation

- Tumoren der Niere sind häufige Neoplasien und zu über 90 % maligne.
- Als Tumoren der Niere werden alle in der Niere lokalisierten Tumoren zusammengefasst, den größten Anteil macht hierbei das Nierenzellkarzinom mit seinen verschiedenen histologischen Subtypen aus.
- Nierentumoren sind sowohl klinisch als auch histopathologisch heterogene Tumoren. Die richtige Diagnosestellung und Zuordnung zu den einzelnen Entitäten ist für den Patienten äußerst wichtig, da die unterschiedlichen Subtypen teilweise erhebliche Unterschiede im Wachstumsverhalten und der Metastasierungsneigung haben und demzufolge auch erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Prognose für den Patienten aufweisen können.
- EpCAM ist ein Glycoprotein auf Zellmembranen epithelialer Zellen, welches einerseits homophile interzelluläre Bindungen vermittelt, andererseits über Induktion von Zellzyklusgenen und Protoonkogenen direkt in Mechanismen der Tumorentstehung eingreifen kann.
- EpCAM wird in unterschiedlicher Intensität auf nahezu allen epithelialen Zellen exprimiert. Nichtepithelialen Zellen exprimieren kein EpCAM.
- Nahezu alle malignen epithelialen Tumoren und deren Vorstufen exprimieren EpCAM. Die Expressionsstärke ist hierbei im Vergleich zum nichtentarteten Ursprungsgewebe meistens erhöht.
- Auch Nierenzellkarzinome exprimieren EpCAM, die unterschiedlichen Subtypen weisen deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke und -häufigkeit auf. Papilläre und chromophobe Karzinome exprimieren deutlich häufiger EpCAM als klarzellige Karzinome oder Onkozytome.
- Schlechter differenzierte Nierentumoren weisen höhere EpCAM-Expressionen auf, dedifferenzierte (sarkomatoide) Tumoren verlieren EpCAM.
- Die EpCAM-Expression von Nierentumoren erlaubt Aussagen hinsichtlich der Prognose von Nierentumoren. Zum einen zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit

eine statistisch signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit EpCAM-positiven Nierentumoren sowie ein statistisch signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben von Patienten mit Nierentumoren mit ausgeprägter EpCAM-Expression im Vergleich zum Restkollektiv. Zum anderen zeigen die Untersuchungen ein statistisch signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben von Patienten mit EpCAM-positiven chromophoben Karzinomen sowie von Patienten mit papillären Karzinomen mit starker EpCAM-Expression.

- EpCAM ist in der täglichen pathologischen Diagnostik ein nützliches Antigen, vor allem bei der Unterscheidung epithelialer und nichtepithelialer Zellen, aber auch in der Differentialdiagnostik der einzelnen Nierentumorentitäten.
- Anti-EpCAM-Antikörper können gezielt EpCAM-exprimierende Tumorzellen zerstören und sind in der Therapie von malignem Aszites EpCAM-positiver Tumoren klinisch bereits zugelassen.
- Die Tissue-Micro-Array Technik erlaubt eine zeit- und materialsparende Untersuchung mehrerer Tumoren. Eine sorgfältige Vorauswahl des Materials ist aber notwendig um mit möglichst hoher Sicherheit ein für den Gesamttumor repräsentatives Material in den kleinen Tumorstanzen zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- [1] *comparative genomic hybridization*. http://de.wikipedia.org/wiki/Comparative_genomic_hybridization, Abruf: 12. März. 2013
- [2] *Krebs in Deutschland 2012*. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Poster/kid_krebskongress2012.pdf?blob=publicationFile, Abruf: 08. März. 2013
- [3] *Nierenkrebs*. <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs.html>, Abruf: 08. März. 2013
- [4] *Nierenkrebs*. <http://de.wikipedia.org/wiki/Nierenkrebs>, Abruf: 11. März. 2013
- [5] *Objektträger*. <http://www.wikipedia.org/wiki/Objektträger>, Abruf: 06. April. 2013
- [6] *Todesursachen*. <http://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/GestorbeneAnzahl.html>, Abruf: 08. März. 2013
- [7] *Tumors of the Kidney, Bladder, and Related Urinary Structures*. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series 4, 2004
- [8] *Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. WHO-Classifikation of Tumours, 2004
- [9] ADKINS, J.C. ; SPENCER, C.M.: Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A). In: *Drugs*, 1998 Oct, 56(4): 619-26 (1998)
- [10] BALZAR, M. ; WINTER, M.J. ; BOER, C.J. de ; LITVINOV, S.V.: The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). In: *J Mol Med* (1999) 77: 699-712 (1999)
- [11] BANNOWSKY, A. ; LEUSCHNER, I. ; SCHILLER, H. ; BOTHE, K. ; OSMONOV, D. ; JÜNEMANN, K.P. ; HAUTMANN, S.: Das sarkomatoide Nierenzellkarzinom. In: *Urologe* 2007, 46: 406-411 (2007)
- [12] BERG, S. ; JACOBS, S.C. ; COHEN, A.J. ; LI, F. ; MARCHETTO, D. ; BROWN, R.S.: The surgical management of hereditary multifocal renal carcinom. In: *J Urol* 1981, 126: 313-315 (1981)

- [13] BONSIB, S.M.: Renal chromophob cell carcinoma: the relationship between cytoplasmatic vesicals and colloidal iron stain. In: *J Urol Pathol* 1996, 4: 9-14 (1996)
- [14] BRUDER, E. ; PASSERA, O. ; HARMS, D. ; LEUSCHNER, I. ; LADANYI, M. ; ARGANI, P. ; EBLE, J.N. ; STRUCKMANN, K. ; SCHRAML, P. ; MOCH, H.: Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. In: *Am J Surg Pathol*, 2004, 28: 1117-1132 (2004)
- [15] BUBENDORF, L. ; KONONEN, J. ; KOIVISTO, P. ; SCHRAML, P. ; MOCH, H. ; GASSER, T.C. ; WILLI, N. ; MIHATSCH, M.J. ; SAUTER, G. ; KALLIONIEMI, O.P.: Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. In: *Cancer Res* 1999; 59: 803-806 (1999)
- [16] CHAUDRY, M.A. ; SALES, K. ; RUF, P. ; LINDHOFER, H. ; WINSLET, M. C.: EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challanges. In: *Brit Jour of Cancer* (2007), 96: 1013-1019 (2007)
- [17] CIOFFI, M. ; DORADO, J. ; BAEUERLE, P.A. ; HEESCHEN, C.: EpCAM/CD3-bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. In: *Clin Cancer Res* 2012; Jan 15; 18(2): 465-74 (2012)
- [18] CIRULLI, V. ; CRISA, L. ; BEATTIE, G.M. ; MALLY, M.I. ; LOPEZ, A.D. ; FANNON, A. ; PTASZNIK, A. ; INVERARDI, L. ; RICORDI, C. ; DEERINCK, T. ; ELLISMAN, M. ; REISFELD, R.A. ; HAYEK, A.: KSA antigen EpCAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. In: *J Cell Biol*, 140: 1519-1534 (1998)
- [19] COHEN, H.T. ; MCGOVERN, F.J.: Renal cell carcinoma. In: *N Engl J Med* 2005, 353: 2477-2490 (2005)
- [20] COUGHLIN, S.S. ; NEATON, J.D. ; RANDALL, B. ; SENGUPTA, A.: Predictors of mortality from kidney cancer in 333,547 men screened for the multiple risk factor intervention. In: *Trial Cancer* 1997, 79: 2171-2177 (1997)
- [21] DAVIS, C.G.: The many faces of epidermal growth factor repeats. In: *New Biol* 2 (5): 410-9 (1990)
- [22] DEBOER, C.J. ; VANKRIEKEN, J.H.J.M. ; RHIJN, C.M. Janssen-Van ; LITVINOV, S.V.: Expression of EpCAM in normal, regenerating, metaplastic and neoplastic liver. In: *J Pathol (in press)* (1999)
- [23] EICHELBERG, C. ; CHUN, F.K. ; BEDKE, J. ; HEUER, R. ; ADAM, M. ; MOCH, H. ; TERRACCIANO, L. ; HINRICHS, K. ; DAHLEM, R. ; FISCH, M. ; SCHLOMM, T. ; SAUTER,

- G. ; MINNER, S.: Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma. In: *Int J Cancer*, 2013, Jun 15: 2948-55 (2013)
- [24] FICARRA, V. ; RIGHETTI, R. ; MARTIGNONI, G. ; D'AMICO, A. ; PILLONI, S. ; RUBILOT-
TA, E. ; MALOSSINI, G. ; MOBILIO, G.: Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear
grading: multivariant analysis of 333 cases. In: *Urol Int* 2001, 67(2): 130-4 (2001)
- [25] FIELDS, A.L. ; KELLER, A. ; SCHWARTZBERG, L. ; BERNARD, S. ; KARDINAL, C. ; COHEN,
A. ; SCHULZ, J. ; EISENBERG, P. ; FORSTER, J. ; WISSEL, P.: Adjuvant therapy with
the monoclonal antibody Edrecolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve
overall survival of patients with stage III colon cancer. In: *J Clin Oncol* 2009; Apr 20;
27(12): 1941-7 (2009)
- [26] FLIEGER, D. ; KUFER, P. ; BEIER, I. ; SAUERBRUCH, T. ; SCHMIDT-WOLF, I.G.H.:
A bispecific single-chain antibody directed against EpCAM/CD3 in combination with
the cytokines interferon α and interleukin-2 efficiently retargets T and CD3+CD56+
natural-killer-like T lymphocytes to EpCAM-expressing tumor cells. In: *Cancer Immunol*
Immunother (2000)49; 441-448 (2000)
- [27] FUHRMAN, S.A. ; LASKY, L.C. ; LIMAS, C.: Prognostic significance of morphologic
parameters in renal cell carcinoma. In: *Am J Surg Pathol*, Oktober 1982; 6(7): 655-663
(1982)
- [28] FUZESI, L. ; COBER, M. ; MITTERMAYER, C.: Collecting duct carcinoma. Cytogenetic
characterization. In: *Histopathologie* 1992, 21: 155-160 (1992)
- [29] FUZESI, L. ; GUNAWAN, B. ; BRAUN, S. ; BERGMANN, F. ; BRAUERS, A. ; EFFERT, P.
; MITTERMAYER, C.: Cytogenetic anlysis of 11 renal oncocytomas: further evidence of
structural rearrangements of 11q13 as a characteristic chromosomal anomaly. In: *Cancer*
Genet Cytogenet, November 1998; 107(1): 1-6 (1998)
- [30] GÖTTLINGER, H.G. ; FUNKE, I. ; JOHNSON, J.P. ; GOKEL, J.M. ; RIETHMÜLLER, G.: The
epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its
biochemical nature tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies.
In: *Int. j. Cancer*, July 1986: 47-53 (1986)
- [31] HEISS, M.M. ; MURAWA, P. ; KORALEWSKI, P. ; KUTARSKA, E. ; KOLESNIK, O.O. ;
IVANCHENKO, V.V. ; DUDNICHENKO, A.S. ; ALEKNAVICIENE, B. ; RAZBADAUSKAS, A.
; GORE, M. ; GANEA-MOTAN, E. ; CIULEANU, T. ; WIMBERGER, P. ; SCHMITTEL, A.
; SCHMALFELDT, B. ; BURGESS, A. ; BOKEMEYER, C. ; LINDHOFER, H. ; LAHR, A. ;
PASONS, S.L.: The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant
ascites due to epithelial cancer: result of a prospective randomized phase II/III trial. In:
Int. J. Cancer: 127, 2209-2221 (2010) (2010)

- [32] HERRMANN, E. ; BIERER, S. ; WULFING, C.: Update on systemic therapies of metastatic renal cell carcinoma. In: *World J. Urol* 2010; 303-309 (2010)
- [33] HIGH, A.S. ; ROBINSON, P.A. ; KLEIN, C.E.: Increased expression of a 38 kDa cell-surface glycoprotein MH99 (KS1/4) in oral mucosal dysplasias. In: *J Oral Pathol Med* 25: 10-13 (1996)
- [34] HOPKINS, C.R.: Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. In: *Trends Biochem Sci* 17: 27-31 (1992)
- [35] ISHIKAWA, I. ; KOVACS, G.: High incidence of papillary renal cell tumours in patients on chronic haemodialysis. In: *Histopathology* 1993;22: 135-139 (1993)
- [36] JIANG, F. ; RICHTER, J. ; SCHRAML, P. ; BUBENDORF, L. ; GASSER, T. ; SAUTER, G. ; MIHATSCH, M. ; MOCH, H.: Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma. Genetic differences between histological subtypes. In: *Am J Pathol* 1998, 153: 1467-1473 (1998)
- [37] KIM, H.L. ; SELIGSON, D. ; LIU, X. ; JANZEN, N. ; BUI, M.H.T. ; YU, H. ; SHI, T. ; FIGLIN, R.A. ; HORVATH, S. ; BELLDEGRUN, A.S.: Using Protein Expressions to Predict Survival in Clear Cell Renal Carcinoma. In: *Clin Cancer Res* 2004;10: 5464-71 (1993)
- [38] KLATTE, T. ; SELIGSON, D. ; LAROCHELLE, J. ; SHUCH, B. ; SAIS, J.W. ; RIGGS, S.B. ; ZOMORODIAN, N. ; KABBINAVAR, F.F. ; PANTUCK, A.J. ; BELLDEGRUN, A.S: Molecular Signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. In: *Cancer epidemiology, Biomarkers Prev* 2009;18:894-900 (2009)
- [39] KONONEN, J. ; BUBENBDORF, L. ; KALLIONIEMI, A. ; BARLUND, M. ; SCHRAML, P. ; LEIGHTON, S. ; TORHORST, J. ; MIHATSCH, M.J. ; SAUTER, G. ; KALLIONIEMI, O.P.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature Med, July 1998: Volume 4, Number 7, 844-847* (1998)
- [40] LINNENBACH, A.J. ; SENG, B.A. ; WU, S. ; ROBBINS, S. ; SCOLLON, M. ; PYRC, J. J. ; DRUCK, T. ; HUEBNER, K.: Retroposition in a Family of Carcinoma-Associated Antigen Genes. In: *Molecular and Cellular Biology, Mar 1993: 1507-1513* (1993)
- [41] LITVINOV, S.V. ; VELDEERS, M.P. ; BAKKER, H.A.M. ; FLEUREN, G.J. ; WARNAAR, S.O.: EpCAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. In: *J Cell Biol* 125: 437-446 (1994)
- [42] MCCUE, P.A. ; GORSTEIN, F.: Genetic markers in renal cell carcinomas. In: *Hum Path* 2001, 32: 1027-1028 (2001)

- [43] McDERMOTT, D.F.: Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. In: *Cancer. Vol.115, Number10, Mai 2009: 2298-2305* (2009)
- [44] McDERMOTT, D.F.: Immunotherapy and targeted therapy combinations in renal cancer. In: *Curr Clin Pharmacol. Vol.6, Number3, August 2011: 207-213* (2011)
- [45] MOMBURG, F. ; MOLDENHAUER, G. ; HÄMMERLING, G.J. ; MÖLLER, P.: Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. In: *Cancer Res 47: 2883-2893* (1987)
- [46] MUENZ, M.: Funktionelle Charakterisierung des Tumor-assoziierten epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM. In: *Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München* (2002)
- [47] MUENZ, M. ; KIEU, C. ; MACK, B. ; SCHMITT, B. ; ZEIDLER, R. ; GIRES, O.: The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. In: *Oncogene 23: 5748-5758* (2004)
- [48] PILANCI, K.N. ; ORDU, C. ; AKPINAR, H. ; BALCI, C. ; BASSÜLÜ, N. ; KÖKSAL, U.I. ; ELBÜKEN, F. ; OKUTUR, K. ; BÜLBÜL, G. ; SAGLAM, S. ; DEMIR, G.: Dramatic response to catumaxomab treatment for malign ascites related to renal cell carcinoma with sarcomatoid differentiation. In: *Am J ther 2014; Apr 11.* (2014)
- [49] RIESENBERG, R. ; BUCHNER, A. ; POHLA, H. ; LINDHOFER, H.: Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (α EpCAM x α CD3). In: *J Histochem Cytochem 2001; 49: 911* (2001)
- [50] RIETHMÜLLER, G. ; HOLZ, E. ; SCHLIMOK, G. ; SCHMIEGEL, W. ; RAAB, R. ; HÖFFKEN, K. ; GRUBER, R. ; FUNKE, I. ; PICHLMAIER, H. ; HIRCHE, H. ; BUGGISH, P. ; WITTE, J. ; PICHLMAYR, R.: Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: Seven-Year Outcome of a multicenter randomized trial. In: *J Clin Oncol 1998; 16: 1788-94* (1998)
- [51] RYAN, C.W. ; VOGELZANG, N.J. ; STADLER, W.M.: A phase II trial of intravenous gemcitabine and 5-fluorouracil with subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha in patients with metastatic renal cell carcinoma. In: *Cancer 2002; 94: 2602-2609* (2002)
- [52] SEIMETZ, D. ; LINDHOFER, H. ; BOKEMEYER, C.: Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. In: *Cancer treatment Reviews 36 (2010) 458-467* (2010)
- [53] SELIGSON, D.B. ; PANTUCK, A.J. ; LIU, X. ; HUANG, Y. ; HORVATH, S. ; BUI, M.H. ; HAN, K.R. ; CORREA, A.J. ; EIVA, M. ; TZE, S. ; BELLDEGRUN, A.S. ; FIGLIN, R.A.: Epithelial

- cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. In: *Clin Cancer Res*, 2004 Apr 15; 10(8): 2659-69 (2004)
- [54] SELLI, C. ; AMOROSI, A. ; VONA, G. ; SESTINI, R. ; TRAVAGLINI, F. ; BARTOLETTI, R. ; ORLANDO, C.: Retrospective evaluation of c-erb-2 oncogene amplifikation using competitive PCR in collecting duct carcinoma of the kidney. In: *J Urol* 158: 245-247 (1997)
- [55] SPEICHER, M.R. ; SCHOELL, B. ; MANOIR, S. du ; SCHROCK, E. ; RIED, T. ; CREMER, T. ; STÖRKEL, S. ; KOVACS, A. ; KOVACS, G.: Specific loss of chromosomes 1,2,6,10,13,17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. In: *Am J Pathol* 1994, 145: 356-364 (1994)
- [56] STEINER, G. ; CAIRNS, P. ; POLASCIK, T.J. ; MARSHALL, F.F. ; EPSTEIN, J.I. ; SIDRANSKY, D. ; SCHOENBERG, M.: High-density mapping of chromosomal arm 1q in renal collecting duct carcinoma: region of minimal deletion at 1q32.1-32.2. In: *Cancer Res* 56: 5044-5046 (1996)
- [57] WENT, P. ; DIRNHOFER, S. ; SALVISBERG, T. ; AMIN, M. B. ; LIM, S. D. ; DIENER, P.-A. ; MOCH, H.: Expression of Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) in Renal Epithelial Tumors. In: *Am J Surg Pathol*, Vol.29, Number1, January 2005 (2005)
- [58] ZHANG, P. ; SHI, B. ; GAO, H. ; JIANG, H. ; KONG, J. ; YAN, J. ; PAN, X. ; LI, K. ; ZHANG, P. ; YAO, M. ; YANG, S. ; GU, J. ; WANG, H. ; LI, Z.: An EpCAM/CD3 bispecific antibody efficiently eliminates hepatocellular carcinoma cells with limited galectin-1 expression. In: *Cancer Immunol Immunother* 2014; Feb; 63(2): 121-32 (2014)
- [59] ZORZOS, J. ; ZIZI, A. ; BAKIRAS, A. ; PECTASIDIS, D. ; SKARLOS, D.V. ; ZORZOS, H. ; ELEMENOGLOU, J. ; LIKOURINAS, M.: Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA 1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. In: *Eur Urol* 28: 251-254 (1995)